

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**ENVOLVIMENTO DE CANAIS DE K<sup>+</sup> E VIAS DEPENDENTES DE  
Ca<sup>++</sup> NO EFEITO ESTIMULATÓRIO DO T<sub>3</sub> NO TRANSPORTE DE  
AMINOÁCIDOS EM TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS**

**KARINE CUNHA VOLPATO**

Florianópolis

2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**ENVOLVIMENTO DE CANAIS DE  $K^+$  E VIAS DEPENDENTES DE  $Ca^{++}$  NO  
EFEITO ESTIMULATÓRIO DO  $T_3$  NO TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS EM  
TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS**

Dissertação de Mestrado Apresentada por Karine Cunha Volpato para Obtenção do Grau de  
Mestre em Farmácia

ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. Dra. FÁTIMA REGINA MENA BARRETO SILVA

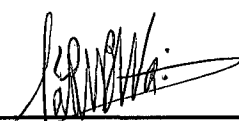
**"ENVOLVIMENTO DE CANAIS DE K<sup>+</sup> E VIAS  
DEPENDENTES DE CA<sup>++</sup> NO EFEITO ESTIMULATÓRIO  
DO T<sub>3</sub> NO TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS EM  
TESTÍCULOS DE RATOS IMATUROS"**

**POR**

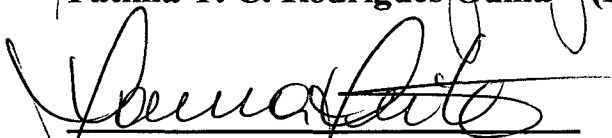
**KARINE CUNHA VOLPATO**

**Dissertação julgada e aprovada em  
sua forma final pelo Orientador e  
membros da Banca Examinadora,  
composta pelos Professores Doutores:**

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
**Fátima Regina Mena B. Silva (BQA/CCB/UFSC – Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Fátima T. C. Rodrigues Guma (BQA/ICBS/UFRGS – Membro Titular)**

  
\_\_\_\_\_  
**Laura Difini Leite (CFS/CCB/UFSC – Membro Titular)**

  
**Prof.ª Dra. Tânia Silvia Fröde**  
**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC**

**Florianópolis, 23 de agosto de 2002.**

Cada pessoa, em sua existência, pode ter duas atitudes: Construir ou Plantar. Os construtores podem demorar anos em suas tarefas, mas um dia terminam aquilo que estavam fazendo. Então param, e ficam limitados por suas próprias paredes. A vida perde sentido quando a construção acaba. Os que plantam sofrem com as tempestades, as estações e raramente descansam. Mas, ao contrário de um edifício, o jardim jamais pára de crescer e, ao mesmo tempo em que exige a atenção do jardineiro, também permite que para ele, a vida seja uma grande aventura.

Paulo Coelho

Dedico esta dissertação aos meus pais, Elviro e Marilda, pelo incansável apoio e incentivo na realização dos meus sonhos e, principalmente, pelo amor incondicional em todos os dias de minha vida.

### Agradecimento especial

À Fátima Regina Mena Barreto Silva pela sua preciosa orientação neste trabalho conduzindo-me com simplicidade e cumplicidade, respeitando pacientemente minha insegurança e inexperiência e, principalmente, mostrando-me o verdadeiro sentido de ser “Mestre”.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos por todo amor e apoio imprescindíveis nesta caminhada e pela compreensão nos momentos que estive ausente.

Ao Carlos que carinhosamente esteve ao meu lado sofrendo com minhas angústias e vibrando com minhas realizações.

A minha colega de laboratório e amiga Ariane pelos ensinamentos, solidariedade e principalmente pelo companheirismo.

À Coordenação e ao Curso de Pós-Graduação em Farmácia pela oportunidade de realizar este trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Farmácia pelos valiosos ensinamentos que contribuíram para minha formação.

À professora Laura pela amizade e bom humor, auxiliando-me na elaboração deste trabalho e pelos inúmeros ensinamentos de vida.

Às professoras Rozângela e Tânia pela gentileza em abrirem as portas de seus laboratórios e compartilharem materiais e equipamentos.

Às colegas de laboratório pela amizade e auxílio durante a realização deste trabalho, e por tornarem nosso laboratório em um maravilhoso ambiente de trabalho.

Ao professor Valdir Soldi que gentilmente ofereceu apoio e incentivo na realização deste trabalho.

Ao Departamento de Farmacologia, especialmente ao professor Calixto e à Elisabete, pelo uso do Espectrômetro de cintilação.

A Claudriana e Andreza pela valiosa amizade e companheirismo e pelo incentivo à pesquisa.

As seguintes instituições pelo apoio financeiro: CNPq e CAPES.

A todos amigos aqui não mencionados que muito contribuíram, de uma maneira ou de outra, para a realização deste sonho.

A todos aqueles que participaram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xvi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xvii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1. Estrutura Funcional dos Testículos.....	1
1.1.1. Células de Sertoli .....	2
1.1.1.1. Estrutura das células de Sertoli .....	3
1.1.1.2. Ação hormonal de resposta rápida em células de Sertoli.....	4
1.2. Mecanismo de Ação Hormonal .....	7
1.2.1. Mecanismos de Ação de Hormônios Esteróides.....	8
1.2.1.1. Mecanismo de ação hormonal genômico.....	8
1.2.1.2. Mecanismo de ação hormonal não-genômico.....	10
1.3. Hormônio 3-5-3'-Triiodo-L-Tironina (T <sub>3</sub> ) .....	12
1.3.1. Considerações Gerais Sobre o T <sub>3</sub> .....	12
1.3.2. Ação do Hormônio T <sub>3</sub> na Membrana Plasmática .....	13
1.4. Transporte de Aminoácidos Através da Membrana Plasmática .....	14
1.4.1. Princípios dos Transportes de Membrana.....	14
1.4.2. Considerações Gerais do Transporte de Aminoácidos .....	17
1.4.3. Sistemas de Transporte de Aminoácidos .....	18
1.4.3.1. Sistema "A" de transporte de aminoácidos.....	19
1.5. Cálcio .....	20
1.5.1. Cálcio Celular (Ca <sup>++</sup> ).....	20
1.5.2. Ca <sup>++</sup> Como Sinal Intracelular.....	21
1.5.3. Canais de Cálcio .....	23
1.5.3.1. Canais de cálcio dependentes da voltagem (CCDV).....	23
1.5.3.1.1. Canais do tipo L .....	24
1.5.3.1.2. Canais do tipo T .....	24



1.5.4. Envolvimento do Íon $\text{Ca}^{++}$ e de CCDV na Ação Hormonal .....	25
1.6. Canais de Potássio ( $\text{K}^+$ ) .....	28
1.6.1. Canais de $\text{K}^+$ Sensíveis à Voltagem.....	28
1.6.2. Canais de $\text{K}^+$ Sensíveis ao ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) .....	29
1.6.3. Canais de $\text{K}^+$ Sensíveis ao $\text{Ca}^{++}$ ( $\text{K}_{\text{Ca}}$ ).....	30
1.7. Canais de Cloreto ( $\text{Cl}^-$ ).....	31
1.7.1. Família CLC de Canais de Cloreto .....	32
1.7.2. Canais de Cloreto Tipo CFTR (Regulador da Condutância de Transmembrana na Fibrose Cística).....	32
1.7.3. Canais de Cloreto Ligados a Receptores .....	33
1.7.4. Canais de Cloreto Ativados pelo $\text{Ca}^{++}$ .....	33
1.8. Objetivos.....	35
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
2.1. Materiais .....	36
2.1.1. Soluções Utilizadas.....	36
2.1.1.1. Tampão Krebs-Ringer-bicarbonato (KRb) .....	36
2.1.2. Substâncias Utilizadas .....	37
2.1.2.1. EGTA.....	37
2.1.2.2. Verapamil.....	37
2.1.2.3. BAPTA-AM.....	37
2.1.2.4. Tolbutamida .....	38
2.1.2.5. Ácido carboxílico 9-antraceno .....	38
2.1.2.6. Hormônio 3,5,3'-triodo-L-tironina ( $\text{T}_3$ ).....	38
2.1.2.7. Líquido de Cintilação.....	38
2.1.2.8. Aminoácido MeAIB- $^{14}\text{C}$ .....	38
2.1.3. Equipamentos Utilizados .....	39
2.2. Métodos .....	39
2.2.1. Animais Experimentais.....	39
2.2.2. Procedimentos Experimentais.....	40
2.2.2.1. Transporte de MeAIB- $^{14}\text{C}$ em testículo .....	40
2.2.2.1.1. Processamento das amostras .....	41
2.2.3. Análise Estatística.....	43

<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
3.1. Curva de Dose-Resposta do Hormônio T <sub>3</sub> no Transporte de MeAIB- <sup>14</sup> C em Testículos de Ratos Imaturos .....	44
3.2. Influência do Ca <sup>++</sup> Extracelular no Transporte de MeAIB- <sup>14</sup> C Basal e Estimulado por T <sub>3</sub> .....	45
3.2.1. Efeito do EGTA no Transporte Basal de Aminoácidos.....	46
3.2.2. Efeito do EGTA na Ação Estimulatória do T <sub>3</sub> no Transporte de Aminoácido .....	47
3.3. Influência de Canais de Ca <sup>++</sup> Dependentes da Voltagem (CCDV) Sobre o Transporte de MeAIB- <sup>14</sup> C Basal e Estimulado por T <sub>3</sub> .....	48
3.3.1. Efeito do Verapamil Sobre o Transporte Basal de Aminoácido.....	48
3.3.2. Efeito do Verapamil na Ação Estimulatória do T <sub>3</sub> no Transporte de Aminoácido.....	49
3.4. Influência do Ca <sup>++</sup> Intracelular no Transporte de MeAIB- <sup>14</sup> C Basal e Estimulado por T <sub>3</sub> .....	50
3.4.1. Efeito do BAPTA no Transporte Basal de Aminoácido.....	50
3.4.2. Efeito do BAPTA-AM na Ação Estimulatória do T <sub>3</sub> no Transporte de Aminoácidos .....	52
3.5. Influência de Canais de Potássio (K <sup>+</sup> ) Sensíveis ao ATP no Transporte de MeAIB- <sup>14</sup> C Basal e Estimulado por T <sub>3</sub> .....	53
3.5.1. Efeito da Tolbutamida no Transporte Basal de Aminoácido.....	53
3.5.2. Efeito da Tolbutamida na Ação Estimulatória do T <sub>3</sub> no Transporte de Aminoácidos .....	54
3.6. Influência de Canais de Cloreto (Cl <sup>-</sup> ) no Transporte de MeAIB- <sup>14</sup> C Basal e Estimulado por T <sub>3</sub> .....	55
3.6.1. Efeito do Ácido Carboxílico 9-Antraceno no Transporte Basal de Aminoácidos .....	55
3.6.2. Efeito do Ácido Carboxílico 9-Antraceno na Ação Estimulatória do T <sub>3</sub> no Transporte de Aminoácido .....	57
<b>4. DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>66</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1:	Diagrama esquemático dos componentes do sistema reprodutor masculino humano .....	2
Figura 1.2:	Estrutura das células de Sertoli .....	4
Figura 1.3:	Estrutura geral de receptores de esteróides .....	8
Figura 1.4:	Modelo de ação hormonal genômica .....	9
Figura 1.5:	Classificação dos mecanismos de ações não-genômicas de esteróides .....	11
Figura 1.6:	Esquema global dos efeitos do hormônio T <sub>3</sub> .....	13
Figura 1.7:	Diagrama esquemático ilustrando as proteínas transportadoras na membrana plasmática. ....	16
Figura 2.1:	Representação esquemática da metodologia do transporte de aminoácidos.....	42
Figura 3.1:	Curva dose-resposta do hormônio T <sub>3</sub> no transporte de MeAIB- <sup>14</sup> C em testículos de ratos imaturos .....	45
Figura 3.2:	Efeito do EGTA no transporte basal de MeAIB- <sup>14</sup> C em testículos de ratos imaturos. ....	46
Figura 3.3:	Efeito do EGTA na ação estimulatória do T <sub>3</sub> no transporte de MeAIB- <sup>14</sup> C em testículos de ratos imaturos.....	47
Figura 3.4:	Efeito do verapamil no transporte basal de MeAIB- <sup>14</sup> C em testículos de ratos imaturos. ....	49
Figura 3.5:	Efeito do verapamil na ação estimulatória do T <sub>3</sub> no transporte de MeAIB- <sup>14</sup> C.....	50
Figura 3.6:	Efeito do BAPTA-AM no transporte basal de MeAIB- <sup>14</sup> C em testículos de ratos imaturos. ....	51
Figura 3.7:	Efeito do BAPTA-AM na ação estimulatória do T <sub>3</sub> no transporte de MeAIB- <sup>14</sup> C em testículos de ratos imaturos. ....	52

Figura 3.8: Efeito da tolbutamida no transporte de MeAIB- <sup>14</sup> C em testículos de ratos imaturos. ....	54
Figura 3.9: Efeito da tolbutamida na ação estimulatória do T <sub>3</sub> no transporte de MeAIB- <sup>14</sup> C em testículos de ratos imaturos. ....	55
Figura 3.10: Efeito do 9-AC no transporte de MeAIB- <sup>14</sup> C em testículos de ratos imaturos. ....	56
Figura 3.11: Efeito do ácido carboxílico 9-antraceno no efeito estimulatório do T <sub>3</sub> no transporte de MeAIB- <sup>14</sup> C em testículos de ratos imaturos .....	57
Figura 4.1: Esquema da hipótese do mecanismo de ação do hormônio T <sub>3</sub> sobre a captação de aminoácidos neutros em testículos de ratos imaturos.....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1:	Família CLC de canais de $\text{Cl}^-$ em mamíferos .....	32
Tabela 2.1:	Soluções estoque para o preparo do KRb.....	36
Tabela 2.2:	Concentrações iônicas do KRb, líquido intra e extracelular .....	37
Tabela 3.1:	Ação do hormônio $\text{T}_3$ , em diferentes concentrações, no transporte de $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$ .....	45
Tabela 3.2:	Efeito do EGTA na captação basal de $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$ em diferentes concentrações .....	46
Tabela 3.3:	Efeito do EGTA na ação estimulatória do $\text{T}_3$ na captação de $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$ .....	47
Tabela 3.4:	Efeito do verapamil na captação basal de $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$ .....	48
Tabela 3.5:	Efeito do verapamil na ação estimulatória do $\text{T}_3$ na captação de $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$ .....	49
Tabela 3.6:	Efeito do BAPTA-AM na captação basal de $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$ .....	51
Tabela 3.7:	Efeito do BAPTA-AM na ação estimulatória do $\text{T}_3$ na captação de $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$ .....	52
Tabela 3.8:	Efeito da tolbutamida na captação basal de $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$ .....	53
Tabela 3.9:	Efeito da tolbutamida na ação estimulatória do $\text{T}_3$ na captação de $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$ .....	54
Tabela 3.10:	Efeito do bloqueador de canal de cloreto 9-AC na captação basal de $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$ .....	56
Tabela 3.11:	Efeito do bloqueador de canais de cloreto 9-AC na ação estimulatória do $\text{T}_3$ na captação de $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$ .....	57

## LISTA DE SÍMBOLOS

[ATP] <sub>i</sub>	Concentração intracelular de ATP
[Ca <sup>++</sup> ] <sub>i</sub>	concentração de cálcio intracelular
μCi	micro-Curie
μL	microlitro
μM	micromolar
°C	grau Celsius
ABP	proteína ligadora de andrógeno
ADP	adenosina difosfato
AIB	ácido á-aminoisobutírico
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
ATPase	adenosina trifosfatase
BAPTA	1,2-bis-(2-aminofenol) etano-N, N, N',N',-tetracético
CCDV	canais de cálcio dependentes da voltagem
cpm	contas por minuto
DHT	dihidrotestosterona
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
EGTA	ácido tetracético etileno glicol
EPM	erro padrão da média
FSH	hormônio folículo estimulante
g	grama
GABA	ácido gama-amino-butírico
HVA	ativados em alta voltagem
IGF-I	fator de crescimento semelhante a insulina I
IP <sub>3</sub>	inositol trifosfato
IVA	ativados em voltagem intermediária

$K_{ATP}$	canal de potássio sensível ao ATP
$K_{Ca}$	canal de potássio sensível ao cálcio
KRb	Krebs Ringer-bicarbonato
L	litro
LH	hormônio luteinizante
LVA	ativados por baixa voltagem
M	molar
MeAIB	ácido metil aminoisobutírico
mEq/L	miliequivalente por litro
mCi	mili Curie
mg	miligrama
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
mmol	milimol
mV	milivolts
n	número de amostras
N	Normal
nM	nanomolar
PKA	proteína quinases A
PKC	proteína quinases C
Pi	fosfato inorgânico
Proteína-G	proteína ligadora de nucleotídeos da guanina
REL	retículo endoplasmático liso
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
s	segundo (s)
SNC	sistema nervoso central
$T_3$	triiodotironina
$T_4$	tiroxina

TRH	hormônio liberador de tireotrofina
T/M	relação tecido meio
v/v	volume por volume



## RESUMO

O hormônio T<sub>3</sub> classicamente atua através de ação nuclear, entretanto vias alternativas de ação deste hormônio são demonstradas em diversos tecidos. Estas ações alternativas, conhecidas como efeitos não-genômicos, estão relacionadas à interação do T<sub>3</sub> em sítios da membrana plasmática e caracterizadas pelo surgimento de respostas celulares rápidas. Em células de Sertoli o hormônio T<sub>3</sub> apresenta ações rápidas na membrana plasmática, estimulando o transporte do aminoácido neutro MeAIB-<sup>14</sup>C e promovendo alterações no potencial de membrana destas células. A relação entre estes eventos de membrana não é clara, porém, acredita-se que o efeito do T<sub>3</sub> em sítios da membrana poderia sinalizar vias que levam a ativação de canais de K<sup>+</sup> e/ou Cl<sup>-</sup>, modulados por cálcio, estimulando o co-transporte de Na<sup>+</sup>-aminoácido (Silva et al., 2001). Desta forma, este trabalho teve como objetivo estudar os mecanismos envolvidos na ação do T<sub>3</sub> na regulação do transporte do aminoácido modelo MeAIB-<sup>14</sup>C em testículos de ratos imaturos, avaliando, com esta finalidade, o envolvimento do íon cálcio, e de canais de cálcio, potássio e cloreto neste sistema de transporte. A ação estimulatória do hormônio T<sub>3</sub> no transporte do aminoácido neutro MeAIB-<sup>14</sup>C foi diminuída pela depleção de cálcio extracelular, pelo bloqueio de canais de cálcio dependentes da voltagem e pela inibição de canais de potássio sensíveis ao ATP. Estes resultados apontam para o envolvimento de canais de potássio e vias dependentes de cálcio no transporte de MeAIB-<sup>14</sup>C estimulado por T<sub>3</sub>. A partir destas evidências conclui-se que estas vias são imprescindíveis para o efeito estimulatório do hormônio T<sub>3</sub> no transporte de MeAIB-<sup>14</sup>C em células de Sertoli. A depleção de estoques intracelulares de cálcio e o bloqueio de canais de cloreto não alteraram o efeito estimulatório do T<sub>3</sub> na captação de MeAIB-<sup>14</sup>C, o que sugere que nem o Ca<sup>++</sup> proveniente dos estoques intracelulares nem estas classes de canais de Cl<sup>-</sup> estudadas, estão diretamente envolvidos na regulação do transporte de aminoácidos neutros por T<sub>3</sub>.

## ABSTRACT

The classical mechanism of action of  $T_3$  is mediated by nuclear receptors. However, other signal transduction pathways are demonstrated in many tissues. These alternative pathways, known non-genomic effects, are characterized by the interaction of  $T_3$  with the cell membrane and by rapid responses. In Sertoli cells,  $T_3$  shows a direct membrane effect on [1- $^{14}C$ ] MeAIB accumulation as well as an immediate change in the cell membrane potential. The relation between these membrane effects is unclear, however, it is possible that the interaction of  $T_3$  with the plasma membrane could trigger signalling pathways which lead to the activation of  $K^+$  and/or  $Cl^-$  channels by intracellular  $Ca^{2+}$ , thus modulating amino acid accumulation (Silva et al., 2001). Therefore, the aim of the present work was to study the involvement of  $Ca^{2+}$  ion and  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  and  $Cl^-$  currents on the stimulatory action of  $T_3$  on [1- $^{14}C$ ] methylaminoisobutyric acid accumulation. This effect was decreased by chelating extracellular calcium and by the blockade of voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channels and ATP-dependent  $K^+$  channels. These results point to the involvement of  $K^+$ -channels and calcium-dependent pathways on amino acid accumulation stimulated by  $T_3$  in Sertoli cell. Therefore, we concluded that these pathways are essential to the stimulatory action of  $T_3$  on amino acid uptake in Sertoli cell. This effect was not changed by the blockade of chloride channels or when intracellular calcium was depleted, suggesting that this type of chloride channel and cytosolic calcium are not directly involved in the mechanism of action of  $T_3$  on amino acid uptake in the testis.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Estrutura Funcional dos Testículos

O sistema reprodutor masculino é formado pelos testículos, epidídimos, ductos genitais intra e extratesticulares, glândulas anexas e pênis.

Os testículos podem ser funcional e anatomicamente divididos em duas partes: tecido intersticial e túbulos seminíferos, responsáveis pela esteroidogênese (biossíntese de esteróides gonadais) e pela espermatogênese (produção de espermatozóides) respectivamente.

Os testículos se desenvolvem dentro da cavidade abdominal e depois descem para o escroto durante o desenvolvimento fetal. Envolvendo cada testículo há uma cápsula fibrosa espessa conhecida como túnica albugínea. Ao longo da borda posterior do testículo, a túnica albugínea projeta-se para o interior, formando o mediastino do testículo, que serve de entrada e saída para os ductos, nervos e vasos testiculares (Aires, 1999).

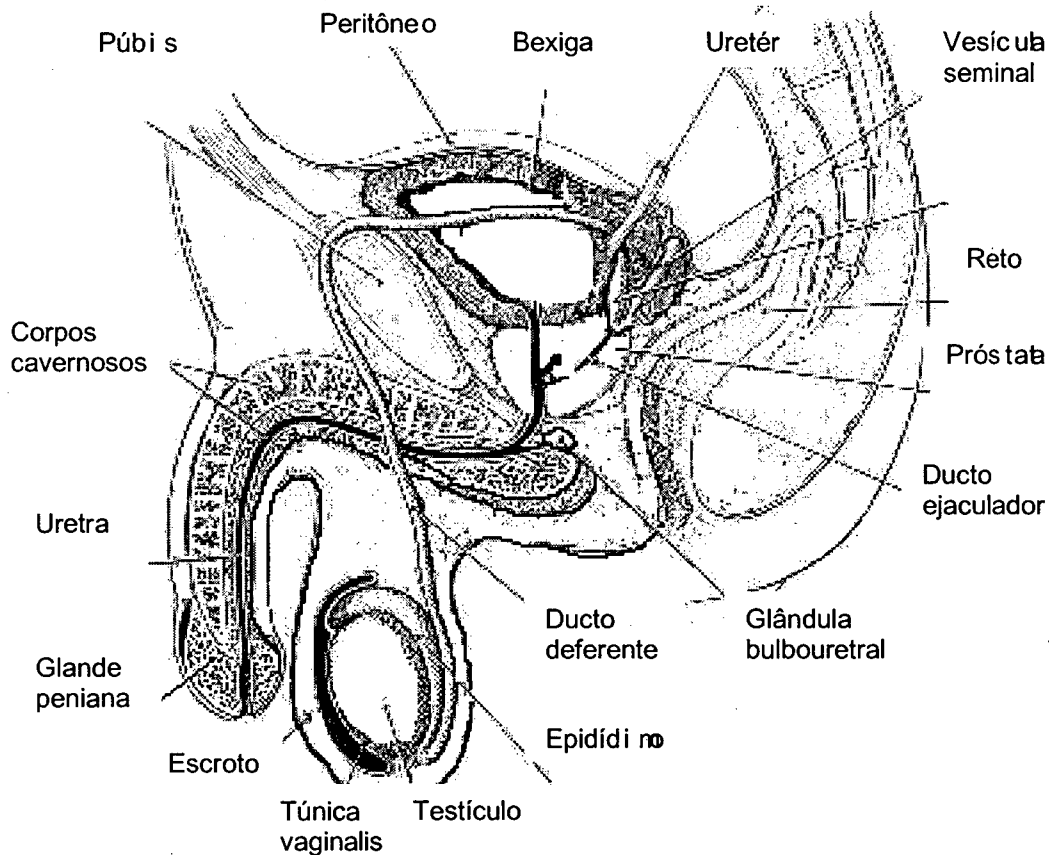
O tecido intersticial é composto de vasos sanguíneos e linfáticos, inúmeros macrófagos, mastócitos e nervos do parênquima testicular. Neste tecido encontram-se também as células de Leydig, porção endócrina do testículo, responsáveis pela secreção de testosterona (Fawcett, 1995).

Os túbulos seminíferos constituem a porção exócrina do testículo, cujo principal produto de secreção são os espermatozóides. Dentro dos testículos, eles encontram-se fortemente enrolados e empacotados, conferindo-lhes uma maior extensão. Este epitélio é constituído por uma população de células com baixa taxa de proliferação, as células de Sertoli, e uma população proliferante que se diferencia, formada por células germinativas. Os túbulos seminíferos são revestidos por células peritubulares ou mióides, que se encontram em contato com a superfície basal das células de Sertoli (Skinner, 1991; Fawcett, 1995).

Durante o desenvolvimento, os túbulos seminíferos apresentam características histológicas específicas para cada uma das fases. No período fetal e impúbere, os testículos

são povoados por dois tipos celulares: células de suporte, precursoras das células de Sertoli do adulto, e células germinativas primordiais ou gonócitos (Courot & Kilgour, 1984).

No adulto, os túbulos seminíferos são formados pelas células de Sertoli, que fornecem suporte estrutural, nutricional e regulatório para o desenvolvimento das células germinativas (Aires, 1999).



*Figura 1.1: Diagrama esquemático dos componentes do sistema reprodutor masculino humano (Fawcett, 1995).*

### 1.1.1. Células de Sertoli

As células de Sertoli foram primeiramente descritas em 1865, pelo fisiologista italiano ENRICO SERTOLI. Em testículos de mamíferos, as células de Sertoli desempenham papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da espermatogênese. Estas células compreendem o principal componente estrutural presente nos túbulos seminíferos.

As células de Sertoli proporcionam apoio mecânico, proteção e nutrição das células germinativas em desenvolvimento. Desempenham, também, um papel ativo na liberação de espermatozoides maduros (Fawcett, 1995).

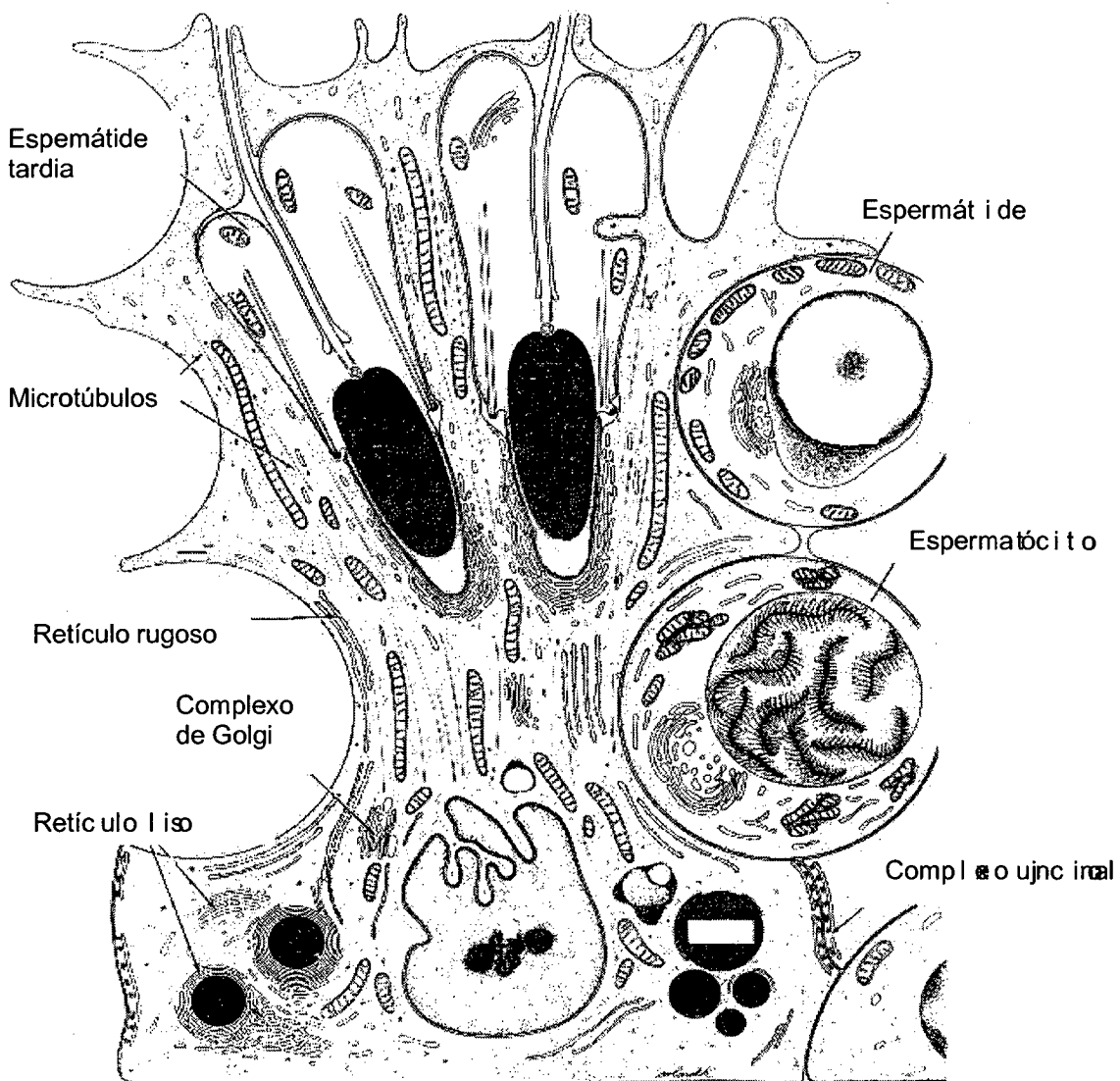
Entre as inúmeras funções atribuídas às estas células estão (Ross & Romrell, 1993):

- A secreção de várias substâncias estimuladoras e inibidoras que participam da regulação da mitose, da meiose, das funções esteroidogênicas das células de Leydig e da liberação de gonadotrofinas pela hipófise;
- A secreção de proteínas que se ligam aos androgênios e que servem para concentrar testosterona no epitélio seminífero e na porção proximal do sistema de ductos genitais.

#### 1.1.1.1. Estrutura das células de Sertoli

As células de Sertoli são células cilíndricas com prolongamentos laterais e apicais complexos que circundam as células espermatogênicas adjacentes e preenchem os espaços entre elas. Estas células conferem organização estrutural aos túbulos à medida que se estendem por toda a espessura do epitélio seminífero. O núcleo da célula de Sertoli contém cromatina finamente dispersa; geralmente é de forma ovóide ou triangular e pode apresentar uma ou mais invaginações profundas. O citoplasma contém grande quantidade de retículo endoplasmático agranular, algum retículo endoplasmático granular, numerosas mitocôndrias, um complexo de Golgi bem desenvolvido e um número variável de microtúbulos, lisossomas, gotículas lipídicas, vesículas, grânulos de glicogênio.

A formação da barreira hemato-testicular em ratos está relacionada com o cessar da proliferação das células de Sertoli e conseqüentemente com o aparecimento das junções oclusivas, que se estabelece por volta da puberdade. O desenvolvimento gradual da barreira é consistente com o padrão de secreção de fluido, o qual aumenta subitamente em torno de 30 dias de idade, mas, somente alcança os níveis adultos aos 40 dias de idade (Setchell & Brooks, 1988).



*Figura 1.2: Estrutura das células de Sertoli (Fawcett, 1995).*

#### 1.1.1.2. Ação hormonal de resposta rápida em células de Sertoli

A célula de Sertoli mostrou-se alvo para a ação de vários hormônios como FSH, testosterona, 3,5,3'-triiodo L-tironina ( $T_3$ ), retinol e  $1\alpha,25(OH)_2$ vitamina $D_3$  (Silva et al., 2002). As funções das células de Sertoli são estritamente reguladas por estes hormônios, assim como por fatores parácrinos, fatores de crescimento e outros, além da regulação exercida pela hipófise. Através destes sinais, as células de Sertoli sofrem diversas alterações e controlam algumas atividades de outras células testiculares.

O mecanismo de ação clássico, através de via genômica, da testosterona, retinol,  $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{vitaminaD}_3$  e do  $\text{T}_3$  é amplamente descrito. Porém, recentemente, muitos autores têm estudado os processos moleculares que envolvem as respostas rápidas (não-genômicas) geradas por hormônios esteróides culminando no controle das células de Sertoli.

Algumas das ações não-genômicas de esteróides envolvem o fluxo iônico de vários íons através da membrana (Silva et al., 2002). Estudos revelam a modulação por esteróides na atividade de canais de cálcio na membrana de diferentes células como osteoblastos (Zanello & Norman, 1997), células musculares (Ruehlmann et al., 1998) e glandulares (Loechner et al., 1999) assim como em canais de  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , e  $\text{Cl}^-$  (Zanello & Norman, 1997; Twyman & MacDonald, 1992; Barann et al., 1999; Valverde et al., 1999; Rabe & Fromter, 2000). Recentes pesquisas identificaram a presença de canais de cálcio dependentes da voltagem na membrana celular em cultura primária de células de Sertoli (Lalevée et al., 1997).

Modelos de estudos eletrofisiológicos e de captação de aminoácidos têm contribuído para a elucidação dos mecanismos de ações rápidas de vários hormônios na membrana plasmática de células de Sertoli, visto que estes modelos são caracterizados por serem eventos ocorridos essencialmente na membrana plasmática.

A testosterona e compostos androgênicos relacionados promovem um aumento rápido e transitório, nos níveis de cálcio intracelular quando aplicada exogenamente, em células de Sertoli. Este aumento rápido na concentração de cálcio foi inibido pela adição de verapamil, um bloqueador de canais de cálcio dependentes da voltagem (Lyng et al., 2000). Este hormônio produz também ação estimulatória na captação de  $^{45}\text{Ca}^{++}$  em células de Sertoli isoladas de testículos em vários estágios de maturação. Leite e colaboradores (1999) demonstraram, também que a testosterona promove uma despolarização imediata ( $<1\text{s}$ ), transitória e dependente da dose em células de Sertoli em ratos púberes e pré-púberes. Este efeito demonstra uma alta especificidade da testosterona por sítios da membrana plasmática em células de Sertoli, através de um efeito rápido, não-genômico, provavelmente envolvendo canais de  $\text{Ca}^{++}$  dependentes da voltagem e o fechamento de canais de  $\text{K}^+$  sensíveis ao ATP.

Assim como a testosterona, o FSH também estimula a captação de  $^{45}\text{Ca}^{++}$  em cultura de células de Sertoli de ratos imaturos (Grasso & Reichert, 1989). Esta entrada de cálcio parece ser mediada por receptores, num processo que envolve canais de cálcio dependentes e independentes da voltagem.

O FSH estimula o aumento do transporte do aminoácido modelo MeAIB-<sup>14</sup>C em células de Sertoli (Irusta & Wassermann, 1972) e esta ação não envolve AMPc diretamente (Perez-Sanches & Wassermann, 1981). Este transporte ocorre através do sistema “A”, é dependente de sódio e energia, e independe da síntese protéica (Bernard & Wassermann, 1982; Spritzer & Wassermann, 1985). Estudos posteriores revelaram que verapamil, cobalto, quinina, e níquel produziram um decréscimo dependente da dose na captação de aminoácido mediado pelo FSH, apontando, assim, para o envolvimento de canais de cálcio dependentes da voltagem, particularmente canais tipo “T”, e canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP (Wassermann & Loss, 1989; Wassermann et al., 1992a).

Evidências de resposta rápida promovida pelo retinol em células de Sertoli foram demonstradas por Wassermann em 1993. Nestas células, o retinol aumentou o transporte de MeAIB-<sup>14</sup>C. Esta captação ocorreu pelo sistema “A” de transporte e foi inibido pelo cobalto e níquel, sugerindo o envolvimento de canais de cálcio dependentes da voltagem (Silva et al., 1995). Além disso, um rápido efeito do retinol na membrana plasmática foi demonstrado em estudos envolvendo a captação de cálcio em células de Sertoli (Wassermann et al., 1995).

Estudos eletrofisiológicos mostraram que o retinol causa uma resposta imediata e oscilatória no potencial de membrana e induz uma redução na resistência das células de Sertoli (Loss et al., 1998). Estas mudanças no potencial de membrana, provavelmente estão associadas à ação estimulatória deste hormônio na captação de aminoácidos e de cálcio (Wassermann et al., 1995; Loss et al., 1998).

A descoberta de receptores funcionais de T<sub>3</sub> em células de Sertoli de testículos pré-púberes, torna esta célula um importante alvo para ação do T<sub>3</sub> durante o desenvolvimento testicular (Palmero, et al., 1995).

O T<sub>3</sub> influencia a esteroideogênese e a gametogênese, afeta a proliferação de células de Sertoli e a formação tubular em testículos de ratos; estimula o transporte de glicose, aumenta a produção de gama-glutamil transpeptidase, proteína ligadora de andrógeno (ABP) e fator-I de crescimento insulina-like (IGF-I); inibe a atividade da aromatase e afeta o metabolismo da testosterona em células de Sertoli (Cooke & Meisami, 1991). Os efeitos bioquímicos do T<sub>3</sub> “in vivo” e “in vitro” demonstram que a célula de Sertoli é o principal alvo de ação dos hormônios tireoideos no testículo (Silva et al., 2002).



Como demonstrado para o FSH, testosterona e retinol, o  $T_3$  também apresenta efeitos rápidos na membrana plasmática de células de Sertoli. Diversos estudos apontam para um efeito do  $T_3$  independente da síntese protéica e/ou dependente de alterações do fluxo iônico em vários tecidos ( Adamson & Ingbar, 1967; Goldfine et al., 1975; Segal & Gordon, 1975; Segal, 1990). Semelhantemente ao FSH, testosterona e retinol, estudos eletrofisiológicos e de captação de aminoácidos têm contribuído para a elucidação do mecanismo de ação não-genômica do  $T_3$  na membrana de células de Sertoli. Silva e colaboradores (2001) demonstraram um efeito estimulatório do  $T_3$  no transporte do aminoácido não-metabolizável MeAIB- $^{14}C$  em células de Sertoli de ratos imaturos. Estudos eletrofisiológicos mostraram, também, que este hormônio produz uma hiperpolarização imediata e transitória na membrana plasmáticas destas células. Os autores sugerem uma integração entre estes dois eventos de membrana, porém os mecanismos que envolvem estes efeitos e as ações do hormônio  $T_3$  na membrana plasmática destas células não foram elucidados, e, portanto, são importantes alvos de novas pesquisas.

## 1.2. Mecanismo de Ação Hormonal

Os hormônios são substâncias secretadas em pequenas quantidades no organismo que atuam como mensageiros químicos exercendo efeitos específicos na atividade bioquímica e/ou fisiológica em células alvo.

Os hormônios podem ser classificados em dois grandes grupos:

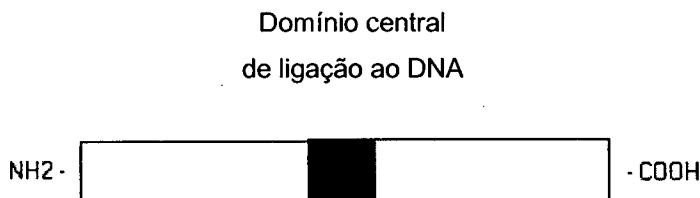
- Os peptídicos e derivados que incluem os hormônios protéicos, fatores de crescimento, neurotransmissores e as catecolaminas (não-peptídicas) que devido suas características hidrofílicas, exercem ações via ligação em receptores localizados na membrana celular;
- Os compostos esteróides que incluem a  $1,25(OH)_2$ vitamina $D_3$  e os hormônios esteróides gonadais e adrenais. Os hormônios tireoideos e o retinol, também estão incluídos nesta classe. Por serem lipofílicos, os hormônios pertencentes a este grupo difundem-se pela membrana plasmática exercendo ações clássicas via receptores intracelulares (Felig et al., 1995).

## 1.2.1. Mecanismos de Ação de Hormônios Esteróides

### 1.2.1.1. Mecanismo de ação hormonal genômico

Os hormônios esteróides classicamente modulam a transcrição gênica por interagirem com receptores intracelulares que atuam como fatores transcricionais.

Embora apresentem diferenças químicas na molécula, os receptores de esteróides, do retinol, da 1,25(OH)<sub>2</sub>vitamina D<sub>3</sub> e do T<sub>3</sub> apresentam homologia estrutural, e por isso, são caracterizados como receptores nucleares pertencentes a uma superfamília denominada de receptores de esteróides. Estes receptores são organizados estruturalmente em três domínios: 1) uma região NH<sub>2</sub>-terminal variável, que pode apresentar efeitos modulatórios na transativação gênica; 2) um domínio central rico em cisteína (esta região pode ser responsável pela ligação ao DNA); 3) um domínio COOH-terminal, que é o sítio de ligação hormonal.



**Figura 1.3:** Estrutura geral de receptores de esteróides  
(Adaptado de Falkestein et al., 2000a).

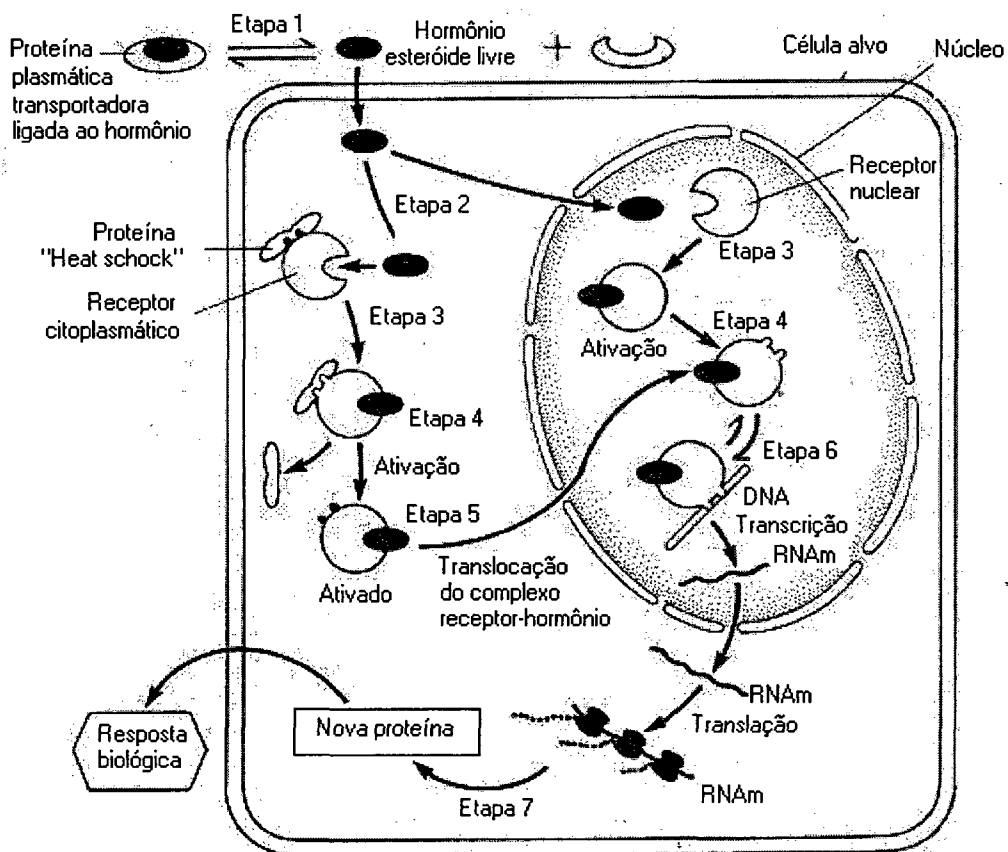
Os hormônios esteróides são moléculas lipofílicas que entram na célula alvo por difusão simples, embora o princípio deste transporte é, ainda, alvo de pesquisas. Chen e Farese (1999), sugeriram que a entrada de hormônios esteróides na célula pode ser mediada por proteínas carreadoras presentes na superfície celular.

No interior das células alvo, os receptores de esteróides apresentam-se associados a proteínas (proteínas “heat-shock”) que modulam a ativação/inativação destes receptores. Quando associados a estas proteínas os receptores permanecem inativados e, portanto, incapazes de gerar respostas biológicas. A ligação do hormônio ao receptor intracelular

específico promove a dissociação destas proteínas moduladoras, produzindo, assim, mudanças alostéricas no receptor. Esta transformação é associada ao aumento da afinidade do receptor ao sítio no DNA.

Apesar da maioria dos receptores de esteróides estarem localizados no núcleo, alguns podem ser encontrados no citosol das células. Estes receptores citosólicos quando associados ao ligante, translocam-se até o núcleo onde se ligarão ao DNA.

Após a ligação do complexo receptor-ligante ao sítio específico do DNA a transcrição é então ativada ou inibida, gerando efeitos conhecidos como efeitos genômicos. Estes efeitos darão início as respostas biológicas promovidas pela ação do hormônio na célula alvo.



*Figura 1.4: Modelo de ação hormonal genômica (Norman & Litwack, 1997).*

### 1.2.1.2. Mecanismo de ação hormonal não-genômico

Nas últimas duas décadas, o mecanismo de ação não-genômico de hormônios esteróides tem recebido grande atenção. Várias evidências apontam para o surgimento de efeitos rápidos:

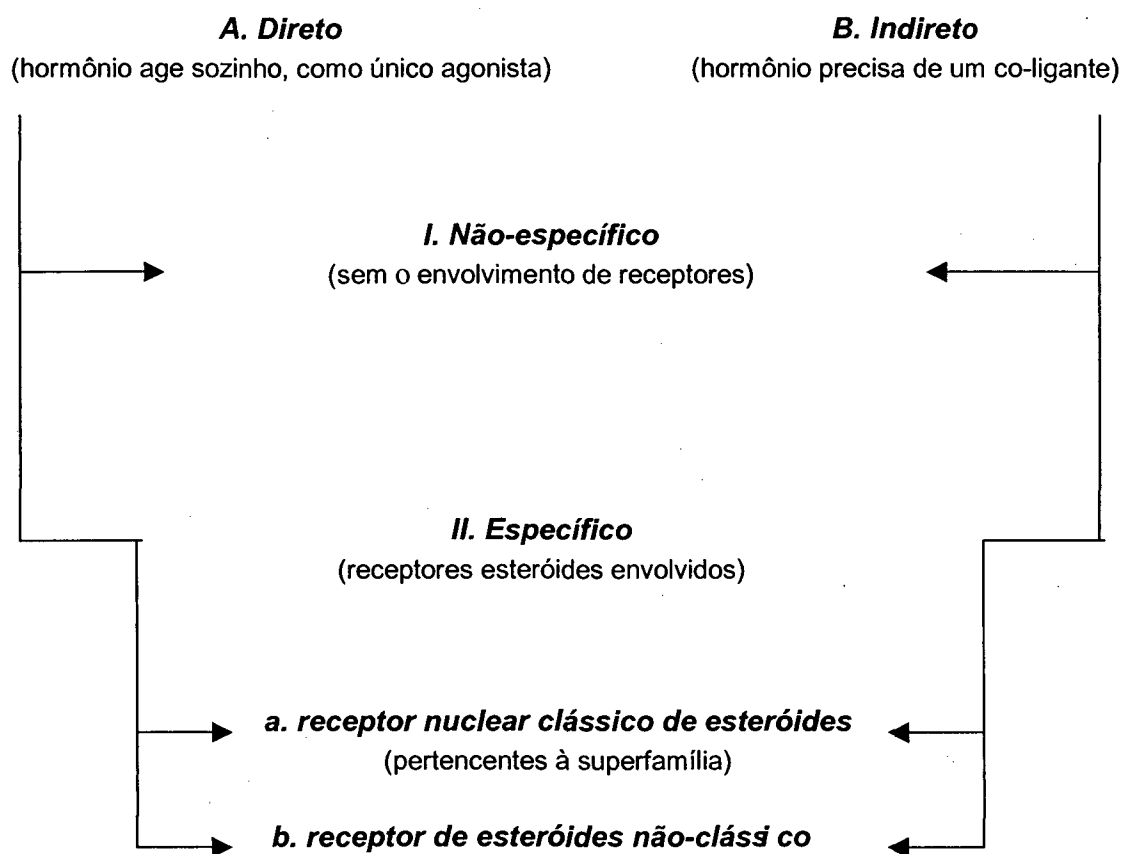
- 1) certos efeitos mediados por hormônios esteróides são tão rápidos (segundos a minutos) que não podem ser atribuídos a ações genômicas (> 30 minutos);
- 2) estes efeitos ocorrem mesmo quando o hormônio está impossibilitado de entrar na célula (associado a proteínas carreadoras);
- 3) estes efeitos rápidos não são bloqueados por inibidores de síntese proteica;
- 4) muitos hormônios esteróides exibem atividade biológica, mesmo quando apresentam pequena ou nenhuma afinidade por receptores esteroidais intracelulares clássicos (Silva et al., 2002).

Estudos mostram uma diversidade de mecanismos que envolvem as ações rápidas de hormônios esteróides, sugerindo que estes mecanismos não são uniformes. Nestes sentido, Falkenstein e colaboradores (2000) propuseram uma classificação para o mecanismo de ação rápida mediado por esteróides. O esquema que mostra esta classificação está apresentado na figura 1.5.

A descoberta destas ações rápidas mediadas por hormônios esteróides sugere que a síntese de macromoléculas como resultado da ação genômica deve ser precedida por mudanças no ambiente celular. Estas mudanças podem incluir alterações no fluxo iônico, através da abertura e fechamento de canais iônicos, geração de segundos mensageiros, importação de açúcares e aminoácidos e fosforilação de enzimas chaves e fatores transcricionais, todas geradas pela ação do hormônio na membrana plasmática (Chen & Farese, 1999).

Apesar das evidências que hormônios esteróides produzem inúmeras respostas biológicas mediadas por ações não-genômicas na célula alvo, muitos aspectos que envolvem este mecanismo ainda requerem intensas pesquisas. Embora as vias que sinalizam efeitos rápidos (não-genômicos) são frequentemente similares, os mecanismos que envolvem estas ações não são uniformes. Além disso, algumas respostas parecem ser restritas a determinados

tecidos ou organismos e desta forma, ações não-genômicas produzidas por hormônios esteróides parecem depender do tipo de hormônio, célula, tecido ou espécie (Falkenstein et al., 2000a).



**Figura 1.5:** Classificação dos mecanismos de ações não-genômicas de esteróides (Falkenstein et al., 2000b).

### 1.3. Hormônio 3-5-3'-Triiodo-L-Tironina (T<sub>3</sub>)

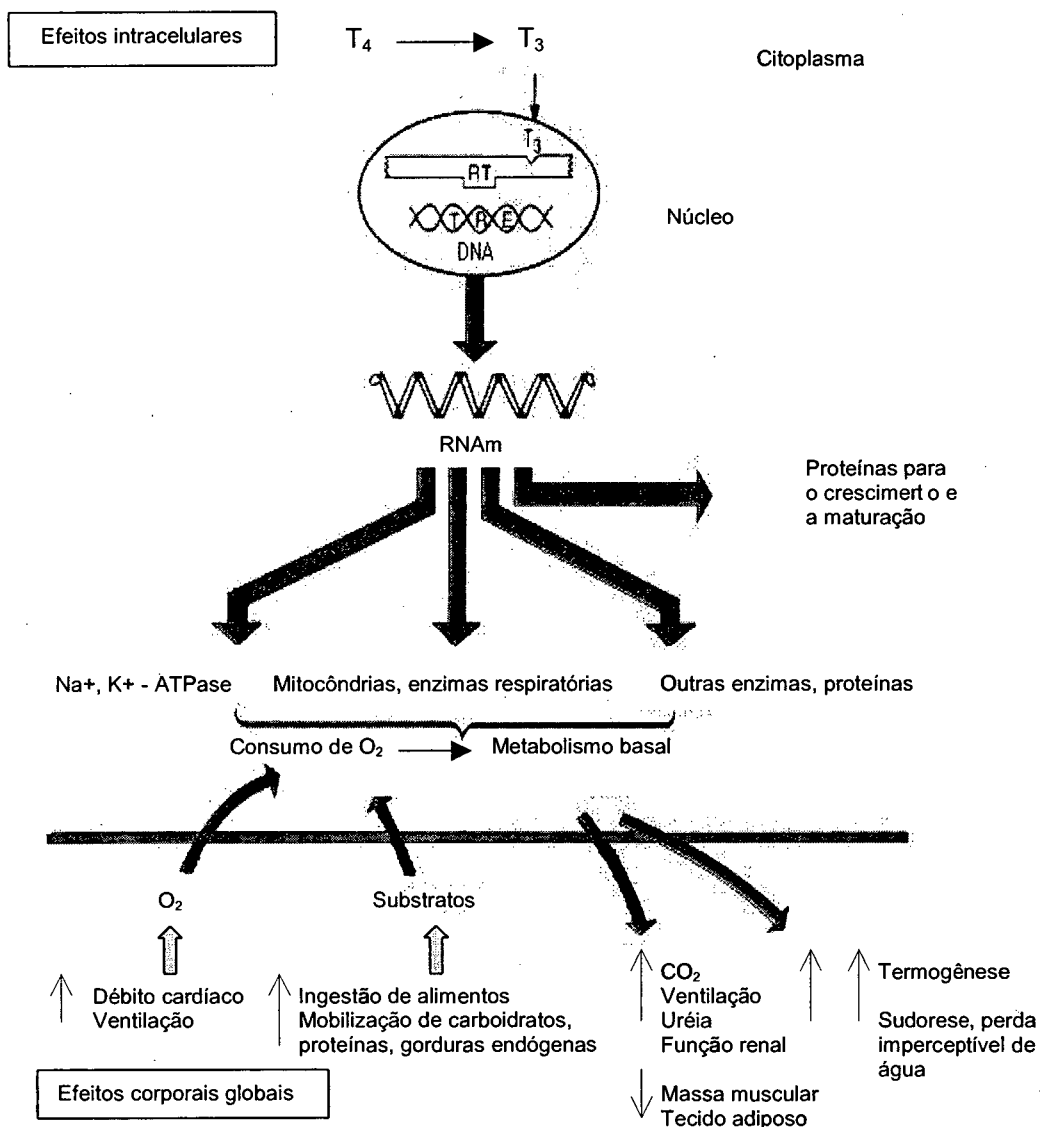
#### 1.3.1. Considerações Gerais Sobre o T<sub>3</sub>

O hormônio 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T<sub>3</sub>) é sintetizado pela glândula tireóide a partir da tirosina e iodeto por um complexo enzimático e é considerado o principal hormônio tireoideo ativo. Este hormônio é responsável pela modulação de vários processos metabólicos em diversos tecidos de mamíferos.

A regulação do metabolismo basal é uma das principais ações globais promovidas pelo T<sub>3</sub>. O aumento do consumo de oxigênio e da produção de calor pelo T<sub>3</sub> é observada em quase todos os tecidos. A utilização de oxigênio e a produção de CO<sub>2</sub> são estimulados por mecanismos que incluem aumento do tamanho e do número de mitocôndrias, da atividade de Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase, dos ritmos de oxidação e de síntese de glicose e ácidos graxos. A maior utilização de oxigênio depende, também, do maior fornecimento de substratos necessários para a oxidação. O T<sub>3</sub> aumenta o fornecimento destes substratos, acelerando a absorção de glicose do trato gastrointestinal e aumentando a mobilização de glicose, proteínas e lipídeos. Outras ações importantes deste hormônio consistem em aumentar a frequência e o débito cardíaco, sendo que estas ações ajudam a atender a demanda tecidual de oxigênio. Efeitos sobre o sistema nervoso central e esqueleto são cruciais para o crescimento e desenvolvimento normal, sendo que na ausência do hormônio, o desenvolvimento cerebral é retardado, a estatura é baixa e os ossos não amadurecem (Segal, 1989). Os efeitos corporais globais produzidos pelo hormônio T<sub>3</sub> são demonstrados na figura 1.6.

Classicamente, o hormônio T<sub>3</sub> exerce ações através da ligação a receptores nucleares promovendo, assim, indução ou repressão da expressão gênica (ações genômicas). Isto acarreta aumentos ou reduções da síntese de proteínas estruturais e funcionais.

Além dos receptores nucleares, foram identificados locais de fixação deste hormônio em ribossomos, mitocôndrias e membrana plasmática. A fixação do T<sub>3</sub> a esses locais pode mediar eventos pós ou pré-transcricionais. Esses mecanismos podem explicar algumas ações deste hormônio que atualmente não podem ser atribuídas à modulação da expressão gênica (Segal, 1989; Wrutniak, et al., 1998; Wrutniak, et al., 2001; Silva et al., 2001).



**Figura 1.6:** Esquema global dos efeitos do hormônio T<sub>3</sub>. A parte superior representa as ações intracelulares que resultam da fixação do T<sub>3</sub> no receptor nuclear, que está sendo acoplado aos elementos reguladores tireoideos nas moléculas-alvo de DNA. A parte inferior cataloga os diversos efeitos corporais totais do T<sub>3</sub>, que tornam possível o maior consumo de oxigênio e permitem a eliminação do excesso de CO<sub>2</sub>, do calor e dos produtos metabólicos (Berne & Levy, 1991).

### 1.3.2. Ação do Hormônio T<sub>3</sub> na Membrana Plasmática

A ação deste hormônio a nível nuclear, envolvendo modulação, expressão de genes e síntese protéica, é bem evidente. Porém, os hormônios tireoideos são capazes, também, de produzir respostas biológicas por vias não-genômicas e assim gerar uma variedade de efeitos rápidos.

Inúmeras pesquisas indicam que o  $T_3$  afeta diretamente diversas funções metabólicas através de ação na membrana plasmática. Estes efeitos são independentes da síntese protéica e são relacionados a mudanças do fluxo celular de íons e substratos. Demonstrou-se que o  $T_3$  promove um rápido aumento, através da membrana, do fluxo de fosfato, sódio, potássio e cloreto (Segal, 1989).

Efeitos promovidos por  $T_3$  na membrana plasmática são descritos em vários tecidos. Receptores deste hormônio foram identificados em fígado de ratos, timócitos, placenta humana, sendo que estes sítios de ligação apresentam propriedades farmacológicas consistentes com os efeitos não-genômicos promovidos por este hormônio (Falkenstein et al., 2000a). Informações adicionais para a ação deste hormônio na membrana plasmática surgiram com a demonstração de que o  $T_3$  produz um aumento dependente da dose na atividade da cálcio-ATPase e na captação da 2-deoxi-Glicose (Segal, 1989).

Em miócitos de ratos o  $T_3$  aumenta o cálcio intracelular ( $[Ca^{++}]_i$ ) em poucos minutos. Efeitos similares deste hormônio envolvendo o transporte de  $Ca^{++}$  na membrana ou o  $[Ca^{++}]_i$  foram mostrados em células hepáticas de ratos e hemácias (Falkestein, 2000a). Desta forma, a ação do hormônio tireoideo na membrana plasmática parece ser o passo inicial na promoção de muitas funções metabólicas promovidas pelo  $T_3$ .

#### **1.4. Transporte de Aminoácidos Através da Membrana Plasmática**

##### **1.4.1. Princípios dos Transportes de Membrana**

A membrana plasmática constitui uma importante estrutura celular que separa os ambientes intra e extracelular. A permeabilidade seletiva é uma importante característica da membrana celular, permitindo o transporte de substâncias para dentro e fora da célula. A passagem de água e outras pequenas moléculas polares, bem como moléculas apolares através da membrana, ocorre por simples difusão. No entanto, a passagem da maior parte das moléculas polares, como íons, açúcares, aminoácidos, nucleotídeos e vários metabólitos celulares, requer a presença de proteínas especiais de membrana, chamadas de proteínas transportadoras. Estas proteínas estão presentes de várias formas e em todos os tipos de



membrana celulares e podem ser agrupadas em três grandes classes: proteínas ATPases (bombas), proteínas carreadoras e proteínas de canal (Figura 1.7).

As proteínas ATPases funcionam como bombas que movimentam ativamente solutos específicos contra um gradiente eletroquímico, para dentro ou para fora da célula. Este tipo de transporte é conhecido como transporte ativo, onde a atividade de bombeamento da proteína transportadora é ligada firmemente a uma fonte de energia. O principal sistema de transporte ativo em muitas células animais é a bomba que retira sódio e simultaneamente acumula potássio no interior da célula. A proteína que constitui essa estrutura celular é chamada  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  e a energia para a produção do transporte é proveniente da hidrólise do ATP a ADP e  $\text{P}_i$ .

As proteínas carreadoras (também chamadas de carregadoras, permeases ou transportadoras), ligam-se ao soluto específico a ser transportado e sofrem uma série de mudanças conformacionais para transferir o soluto ligado através da membrana. Estas proteínas carreadoras podem ser classificadas em: uniportes, simportes e antiportes. As uniportes transportam, a favor de um gradiente de concentração, apenas um soluto por vez. Já as outras proteínas funcionam como transportadoras acopladas, onde a transferência de um soluto de um lado para outro depende da transferência seqüencial ou simultânea de um segundo soluto, seja na mesma direção (simportes) ou na direção contrária (antiportes) (Lodish et al., 1998).

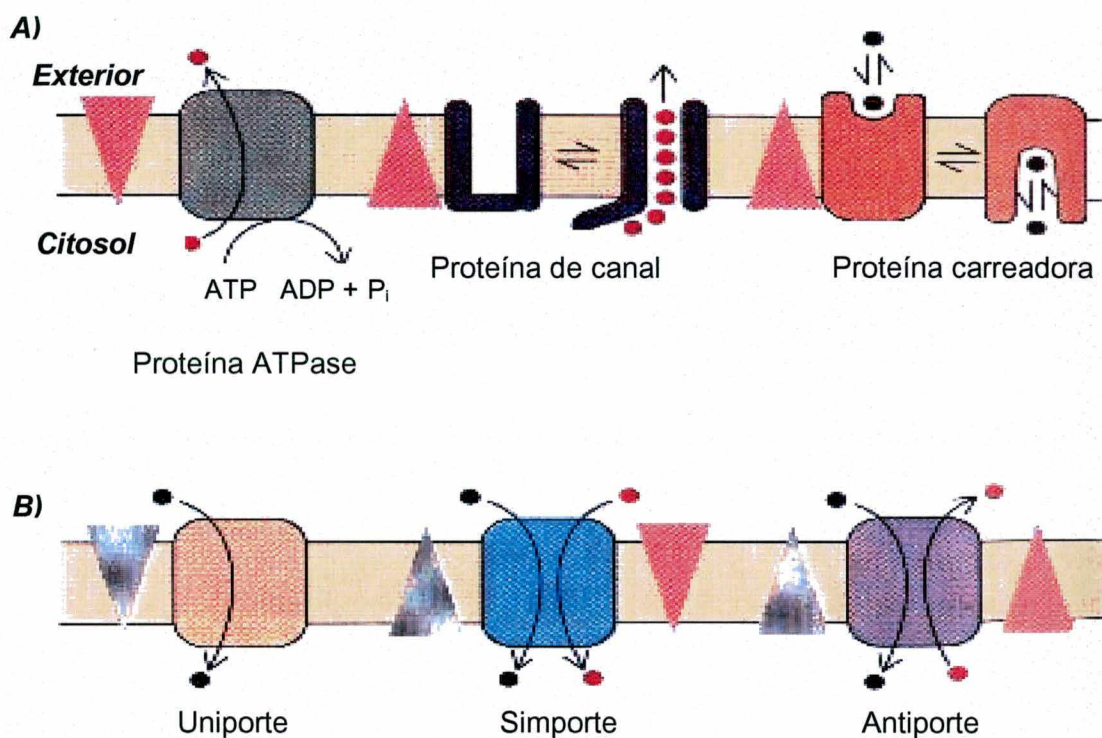
As proteínas de canal funcionam como poros hidrofílicos que atravessam a camada bilipídica, e quando estes poros estão abertos, permitem a passagem de solutos específicos (normalmente íons inorgânicos de tamanho e carga adequada). Porém, estes canais apresentam seletividade iônica, permitindo a passagem apenas de determinados íons.

A abertura e fechamento destes canais são finamente regulados pela célula. Os principais estímulos conhecidos para a abertura destes canais são alterações de voltagem através da membrana (canais dependentes da voltagem); estímulos mecânicos (canais mecânico sensitivos) e ligação de uma molécula sinalizadora (canais dependentes de ligantes).

Todas as proteínas de canal e muitas proteínas carreadoras permitem a passagem dos solutos através da membrana passivamente, e este processo é chamado de difusão facilitada. Se a molécula a ser transportada não tem carga, é somente a diferença de concentração dos

dois lados da membrana (gradiente de concentração) que impulsiona o transporte e determina a direção. Se o soluto é carregado eletricamente, tanto o gradiente de concentração como a diferença de potencial elétrico através da membrana (o potencial de membrana), influenciarão o transporte (Lodish, et al., 1998).

Todas as membranas plasmáticas apresentam uma diferença de potencial elétrico (gradiente de voltagem), sendo que o interior é negativo comparado com o lado externo. Esse potencial favorece a entrada de íons carregados positivamente e se opõe à entrada de íons carregados negativamente.



**Figura 1.7:** Diagrama esquemático ilustrando as proteínas transportadoras na membrana plasmática. (A) Os três maiores grupos de proteínas transportadoras: proteína ATPase, proteína de canal, proteína carreadora. (B) Os três grupos de proteínas carreadoras: uniporte, simporte e antiporte (Lodish et al., 1998).

#### 1.4.2. Considerações Gerais do Transporte de Aminoácidos

O transporte de aminoácidos através da membrana é certamente um evento fundamental para a síntese protéica, para o metabolismo energético e para o crescimento celular. Alterações nas atividades deste transporte podem ter influência na performance do ciclo celular, no controle do crescimento celular e do desenvolvimento de tecidos, no envelhecimento celular e em progressões neoplásicas (Guidotti et al., 1978).

Porém, o processo molecular deste transporte, não se limita apenas à seqüência ligação-translocação-dissociação entre o substrato e a proteína transportadora, e inclui mecanismos regulatórios que continuamente se adaptam a eficiência do transporte. Se uma regulação rigorosa do transporte de aminoácidos for crítica para uma função celular definida, qualquer entendimento dessa interação requer informações sobre o mecanismo de controle que afeta o sistema específico de transporte envolvido (Guidotti et al., 1974).

Os níveis intracelulares da maioria dos aminoácidos são regulados de forma a ajustarem-se às necessidades nutricionais da célula.

A maioria dos aminoácidos é transportada ativamente para o interior da célula chegando a atingir concentrações de 2 a 20 vezes maiores que no meio extracelular. O transporte de aminoácidos está ligado ao gradiente eletroquímico de sódio, estabelecido pelo transporte ativo para fora das células, o que proporciona a energia para o transporte ativo do soluto orgânico. Assim, a molécula transportadora de aminoácidos também possui um sítio de ligação para o sódio. A interação do íon com a molécula carreadora, aumenta a afinidade do sítio para o aminoácido. Uma vez que a concentração de sódio intracelular é baixa, a possibilidade de interação com a molécula carreadora, no interior da célula é reduzida. Assim o gradiente de sódio através da membrana conduz a uma simetria nas afinidades do carreador do aminoácido para o interior da célula (Guidotti et al., 1974).

Além do  $\text{Na}^+$ , a influência de vários outros íons como  $\text{K}^+$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{Li}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , no transporte de aminoácidos, foi avaliada. O gradiente iônico é um fator importante no movimento energizado de aminoácidos através da membrana plasmática. Desta forma, estes íons podem funcionar como co-substratos e estimular a captação de aminoácidos, promover a desestabilização das proteínas transportadoras, ou então, alterar a permeabilidade da membrana a substratos específicos e assim diminuir o transporte (Lerner, 1985).

O íon  $\text{Cl}^-$  mostrou estimular o transporte de alguns aminoácidos neutros em hemácias humanas. Os efeitos do  $\text{Cl}^-$  no transporte pode envolver alterações no potencial de membrana da célula devido a rápida difusão deste ânion através da membrana (Lerner, 1985).

#### 1.4.3. Sistemas de Transporte de Aminoácidos

O transporte de aminoácidos na membrana é efetuado através de sistemas de transporte que apresentam propriedades específicas, incluindo diferente reatividade aos substratos, dependência de íons e de energia, sensibilidade ao pH e inibidores metabólicos, capacidade de trocas por difusão e comportamento cinético definido.

São três os principais sistemas de transportes de aminoácidos neutros: Sistemas “A”, “ASC” e “L”.

Estes sistemas são estereoespecíficos, transportando L-aminoácidos mais rapidamente que D-aminoácidos. Além disto, eles apresentam uma especificidade com o substrato bem menor quando comparado com a maioria das enzimas e, portanto, vários aminoácidos diferentes podem ser transportados por um sistema de transporte e em geral sistemas de transportes diferentes, com especificidades superpostas podem ocorrer na mesma membrana celular (McGivan & Pastor-Anglada, 1994).

Os sistemas de transportes podem ser diferenciados em duas categorias, aqueles que catalisam o uniporte de aminoácidos e aqueles que catalisam o simporte eletrogênico ( $\text{Na}^+$ -aminoácido). Em 1955, Christensen desenvolveu aminoácidos análogos aos aminoácidos naturais, com as características importantes de não serem metabolizados por células eucarióticas e terem a entrada restrita à possivelmente apenas um sistema de transporte.

O ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico ( $\alpha$ -AIB ou AIB) é um substrato modelo para o sistema “A”, mas, sua captação pode ocorrer por múltiplos sistemas de transportes em vários tipos celulares, não devendo ser identificado somente como substrato para o sistema “A” (Le Cam & Freychet, 1977; Kilberg et al., 1979; Bass et al., 1981; Shotwell et al., 1981). Já o análogo ácido  $\alpha$ -metilaminoisobutírico ( $\alpha$ -MeAIB ou MeAIB) é um substrato específico para o sistema “A” e desta forma é freqüentemente usado como marcador para o estudo dos mecanismos que envolvem o transporte de aminoácidos através deste sistema.

#### 1.4.3.1. Sistema “A” de transporte de aminoácidos

O sistema “A” (alanina) é amplamente distribuído em todos os tipos celulares nos mamíferos. É caracterizado, entre outros fatores, por ser dependente de  $\text{Na}^+$  e energia, sensível a variações de pH, diminuindo a atividade quando o pH extracelular diminui e sensível a inibidores metabólicos. A captação de aminoácidos pelo sistema A é dirigida pelo gradiente eletroquímico de sódio (Norman & Mann, 1988). A remoção deste íon do meio extracelular gera um decréscimo deste tipo de transporte (Bikhazi et al., 1985). O movimento de sódio para o interior da célula como co-substrato ocorre em resposta a um potencial de membrana negativo. Por este motivo este sistema é caracterizado por ser dependente, também, do funcionamento normal da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. O funcionamento deficiente da bomba resulta em aumento da concentração de sódio intracelular. Isto reduz o gradiente de  $\text{Na}^+$  no qual está acoplado o transporte de aminoácidos (Lerner, 1985). A ação de um potente inibidor da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, o glicosídeo cardíaco ouabaína, produz em adrenal bovina, uma forte queda no transporte basal de aminoácidos e uma inibição total da ação estimulatória da insulina (Wassermann et al., 1994). Também em testículos de ratos imaturos, a ouabaína inibe sensivelmente o transporte de MeAIB- $^{14}\text{C}$  estimulado por retinol (Wassermann, et al., 1993).

O sistema “A” é eletrogênico e responsivo ao potencial de membrana. Uma alteração sobre o potencial de membrana pode alterar a cinética do transportador (Geck & Heinz, 1976).

Este sistema apresenta uma ampla reatividade entre os aminoácidos com cadeias laterais curtas, polares ou lineares como alanina, glicina e o análogo não metabolizável ácido 2-aminoisobutírico (AIB) e seu derivado N-metilado, ácido 2-metilaminoisobutírico (MeAIB) (Shotwell et al., 1983). A tolerância a um grupo N-metilado nos substratos é uma propriedade importante que o diferencia dos sistemas “ASC” e “L” (Guidotti et al., 1978). A atividade deste sistema de transporte é modulada por diferentes fatores como: hormônios, fatores de crescimento, restrição alimentar e estresse hiperosmótico (McGivan, 1996).

A regulação do transporte de aminoácidos mediada por hormônios foi investigada em uma variedade de tecidos. Vários hormônios mostraram participar da modulação deste transporte, sendo que para a maioria dos hormônios investigados a regulação realiza-se através do sistema “A”.

Na regulação rápida podemos citar os efeitos do FSH (Wassermann et al., 1992a; Silva & Wassermann, 1999), retinol (Wassermann, et al., 1993), isoproterenol (Wassermann et al., 1996) e T<sub>3</sub> (Silva et al., 2001) em estimular o transporte de aminoácidos por um mecanismo de rápida resposta, independente da síntese de proteínas.

A regulação lenta (de longo prazo) caracteriza-se pelo envolvimento da transcrição gênica, da síntese e da glicosilação de proteínas. O hormônio insulina, entre outros, aumenta a atividade do transporte através do aumento do número de transportadores (Edmondson & Lumeng, 1980). Porém, os efeitos hormonais na captação de aminoácidos representam processos moleculares que diferem quanto à natureza do hormônio, o mecanismo de ação envolvido, os sítios de ação e os tipos celulares.

## 1.5. Cálcio

### 1.5.1. Cálcio Celular (Ca<sup>++</sup>)

O Ca<sup>++</sup> é essencial para o crescimento e sobrevivência celular e têm grande participação na regulação de muitos processos celulares. Este íon atua como um importante segundo mensageiro na transdução de sinais intracelulares.

Diferentemente de muitos outros segundos mensageiros, o cálcio é indispensável à vida, ainda que níveis intracelulares deste íon, aumentados por longo tempo, possam ocasionar morte celular (Clapham, 1995). Por isso, é essencial que os níveis intracelulares deste elemento sejam mantidos sob estrito controle (Davila,1999).

Os níveis intracelulares de cálcio (~ 100 nM) são até 20.000 vezes menores que os níveis de cálcio extracelular (2 mM). A manutenção deste gradiente depende de diversos fatores relacionados com a movimentação do íon na membrana plasmática e na membrana de organelas que são capazes de armazenar o Ca<sup>++</sup>. A concentração de cálcio intracelular é controlada pela captação e liberação através de três sistemas de membranas: plasmática,

mitocondrial e do retículo endoplasmático. Cada uma destas membranas possui distintos mecanismos, que atuam modulando a concentração de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular (Khanna et al., 1988).

Para manter a homeostasia do cálcio através da redução dos níveis citoplasmáticos, as membranas plasmáticas e de organelas dispõem de um sistema regulatório que bombeia o cálcio para fora do citoplasma.

Na membrana plasmática existem pelo menos dois tipos de mecanismos dependentes de energia que bombeiam o cálcio para fora da célula. O primeiro é o sistema de troca de  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{++}$ , que utiliza o gradiente de  $\text{Na}^+$  através da membrana (mantido pela atividade da bomba de  $\text{Na}^+$ ) para dirigir o efluxo de cálcio, apresentando uma estequiometria de 3  $\text{Na}^+$  para 2  $\text{Ca}^{++}$ . Este sistema opera com alta capacidade e baixa afinidade, sendo importante para dirigir grandes quantidades de cálcio para fora da célula. O segundo sistema é a bomba  $\text{Ca}^{++}$  - ATPase que é caracterizado por ter baixa capacidade e alta afinidade. Este sistema é relevante na manutenção da homeostasia do cálcio intracelular. Esta bomba de cálcio é regulada por diversos fatores e é a principal responsável pela manutenção da baixa  $[\text{Ca}^{++}]_i$ . O aumento da concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{++}$  leva ao aumento da atividade da bomba com gasto de energia. Esta atividade é modulada principalmente através da ativação, pelo cálcio, da calmodulina (Petersen et al., 1994).

No retículo endoplasmático a entrada de cálcio é feita, também, através de uma bomba  $\text{Ca}^{++}$ -ATPase. Já a liberação do cálcio do retículo é feita principalmente através de canais de cálcio induzidos por inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) (Clapham, 1995).

A mitocôndria tem um papel secundário na homeostasia do cálcio celular. Sua função se restringe a um depósito apenas em momentos de excessiva captação deste íon pela célula. O movimento do cálcio se faz através de um uniporte dirigido por um gradiente eletroquímico na membrana.

### 1.5.2. $\text{Ca}^{++}$ como Sinal Intracelular

O cálcio é um dos mais importantes sinalizadores intracelulares, mediando respostas a estímulos promovidos por hormônios ou neurotransmissores. Porém, esta transdução de sinais mediada pelo cálcio, requer um aumento da concentração citoplasmática deste íon. Duas vias

principais são responsáveis pelo aumento intracelular de  $\text{Ca}^{++}$ : 1) o influxo de cálcio extracelular através da membrana plasmática, via abertura de canais; 2) a liberação de cálcio de reservatórios intracelulares, como o retículo endoplasmático (Clapham,1995).

A liberação de cálcio de estoques intracelulares é mediada, principalmente, pelo inositol 1,4,5- trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). Este sinalizador é produzido através da hidrólise de fosfolípídeos de membrana catalisada pela fosfolipase C. Duas classes de receptores estão envolvidas nestes mecanismos: Receptor acoplado a proteína G e receptor tirosina quinase. Estes receptores, quando ativados por ligantes, ativam fosfolipases C que convertem fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato em  $\text{IP}_3$  e diacilglicerol. O  $\text{IP}_3$  atua em receptores de membrana no retículo endoplasmático sinalizando a liberação de cálcio destes estoques (Clapham,1995).

O influxo de cálcio extracelular através de canais localizados na membrana plasmática, também contribui para elevação do  $[\text{Ca}^{++}]_i$ . Em células não excitáveis, uma hiperpolarização da membrana plasmática (através da abertura de canais de  $\text{K}^+$ ) torna o potencial elétrico da célula mais negativo e conseqüentemente aumenta a velocidade de entrada do  $\text{Ca}^{++}$  a favor de um gradiente eletroquímico. Em células excitáveis, a presença de canais de cálcio dependentes da voltagem, permite o aumento dos níveis citosólicos de cálcio muito mais rapidamente. Nestas células, uma despolarização de membrana inicia mudanças conformacionais nos canais de cálcio dependentes da voltagem. Estas alterações conformacionais catalizam a entrada de cálcio na célula. Porém, a grande diversidade destes canais faz com que eles atuem em uma grande faixa de potenciais de membrana (- 90 a + 60 mV) (Clapham,1995).

O influxo de cálcio como conseqüência da estimulação por um sinal externo, é requerido em vários tecidos para que ocorra a resposta, sendo que, na maioria dos tecidos, os passos intermediários envolvidos ainda são desconhecidos. Hormônios, neurotransmissores ou fatores de crescimento controlam, de forma dependente de  $\text{Ca}^{++}$ , vários processos celulares como: o crescimento e o ciclo celular (Clapham, 1995), a ativação de sistemas enzimáticos, a secreção, a síntese de segundos mensageiros, o transporte de açúcares e aminoácidos (Bronston & Bronston, 1980; Wassermann, et al., 1992a). Demonstrou-se, também que, a transcrição gênica é afetada pelos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{++}$  e por vias de entrada deste íon na célula (Clapham, 1995).



### 1.5.3. Canais de Cálcio

Devido à permeabilidade da membrana ao  $\text{Ca}^{++}$  ser muito baixa, a entrada deste íon na célula está restrita a canais específicos. Estes canais são proteínas de membrana que apresentam poros funcionais para passagem do cálcio. O fluxo iônico é direcionado pelo gradiente eletroquímico existente na membrana (Koester & Siegelbaum, 1995).

Existe uma grande diversidade de canais de  $\text{Ca}^{++}$ , caracterizados por diferenças fundamentais nos mecanismos que governam a abertura e fechamento destes canais. Alguns canais são dependentes da voltagem e a abertura acontece em resposta a uma alteração do potencial elétrico existente através da membrana plasmática. Outros canais são abertos em resposta à ativação de receptores associados a canais de membrana (Hosey & Lazdunski, 1988).

#### 1.5.3.1. Canais de cálcio dependentes da voltagem (CCDV)

Os canais de cálcio dependentes da voltagem servem como um importante mecanismo para o fluxo rápido de cálcio para dentro da célula, através da membrana plasmática (Davila, 1999).

A atividade destes canais é modulada pela variação do potencial de membrana da célula. Uma diversidade de canais de cálcio dependentes da voltagem é descrita em células excitáveis e não-excitáveis. Os tipos de CCDV diferem entre si pela sensibilidade à voltagem, por propriedades cinéticas, pela afinidade a fármacos e pela estrutura. A conformação do canal é sensível à variação de potencial elétrico através da membrana da célula (Davila, 1999).

Apesar do controle do canal se dar predominantemente à modificação do potencial de membrana, esta sensibilidade pode ser modificada por alguns fatores como: a fosforilação do canal, a ligação de uma proteína G ao canal e a ligação de fármacos com afinidade específica aos canais (Spedding & Paolette, 1992).

Em função das atividades eletrofisiológicas, os CCDV podem ser classificados em (Davila, 1999):

- Ativados por alta voltagem (HVA-High Voltage Activated) que incluem canais tipo L, N, P, Q;
- Ativados por voltagem intermediária (IVA-Intermediate Voltage Activated) que inclui o tipo R;
- Ativados por baixa voltagem (LVA-Low Voltage Activated) que inclui o tipo T. Alguns autores consideram apenas dois tipos de CCDV e incluem o canal tipo R como sendo de alta voltagem.

Canais de cálcio dependentes da voltagem tipo “L” e tipo “T” mostraram-se envolvidos no transporte de aminoácidos neutros em células de Sertoli (Silva et al., 2002).

#### 1.5.3.1.1. Canais do tipo L

São altamente distribuídos nos tecidos excitáveis, principalmente no coração, músculo liso e esquelético e em muitas células não excitáveis. Controlam a liberação de hormônios em células endócrinas ou transmissores em alguns neurônios. Esses canais são ativados por faixas de alta voltagem.

Três tipos de classes de fármacos se ligam à estrutura dos canais do tipo L: as fenilalquilaminas, os benzodiazepínicos e as dihidropiridinas. Estas drogas se ligam a sítios diferentes do receptor, específicos para cada classe, que, entretanto estão ligados alostericamente (Hockerman et al., 1997).

A afinidade das fenilalquilaminas aos canais do tipo L depende das mudanças conformacionais moduladas pela variação do potencial. A ligação destes fármacos é alostérica, inibindo a ligação das demais classes de drogas (Hockerman et al., 1997). O verapamil é a fenilalquilamina mais utilizada clinicamente.

#### 1.5.3.1.2. Canais do tipo T

Os CCDV do tipo T apresentam características eletrofisiológicas que os diferenciam facilmente dos demais. São ativados por baixas voltagens, abrindo-se em potenciais muito

negativos. A baixa condutância e a lenta cinética de desativação são as propriedades biofísicas mais marcantes destes canais (Davila, 1999).

O papel fisiológico desta classe de canais inclui uma contribuição no potencial marcapasso de células cardíacas e na manutenção de disparos repetitivos, ou auto disparos, de alguns neurônios centrais. Também estão envolvidos no controle da secreção hormonal de algumas células endócrinas. Acredita-se estarem, também, correlacionados com a expressão e transformação oncogênica, com a aderência, o desenvolvimento e a diferenciação celular em vários tecidos, sugerindo outro papel fisiológico para estes canais (Chen & Hess, 1990).

As propriedades farmacológicas dos canais tipo T são fontes de debate. A sensibilidade ao níquel ( $Ni^{++}$ ) parece não ser um parâmetro confiável para caracterização do canal, devido a grande variabilidade de sensibilidade apresentada pelas subunidades destes canais ao  $Ni^{++}$ . Além disto, CCDV tipo L também podem ser bloqueados por este íon. Novos fármacos, como mibefradil, foram propostos como bloqueadores relativamente específicos para estes canais (Davila, 1999).

Canais de cálcio dependentes da voltagem do tipo T foram caracterizados em células de Sertoli (Wassermann et al., 1992a; Lalevée et al., 1997).

#### 1.5.4. Envolvimento do Íon $Ca^{++}$ e de CCDV na Ação Hormonal

Muitos hormônios utilizam o  $Ca^{++}$  como mensageiro celular, sendo que a mobilização do cálcio para o interior do citoplasma pode ocorrer tanto pela abertura de canais ou da atividade de trocadores na membrana plasmática, como a mobilização de estoques intracelulares.

Estudos com o FSH mostraram que a ação deste hormônio sobre o transporte de aminoácidos em células de Sertoli depende da entrada de cálcio extracelular. O bloqueio de canais de cálcio dependentes da voltagem com verapamil (Wassermann & Loss, 1989),  $Co^{+2}$  e  $Ni^{2+}$  anula o aumento do transporte produzido por este hormônio (Wassermann et al., 1992a).

O FSH aumenta, também, o influxo de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  em células de Sertoli, e este influxo é inibido parcialmente por bloqueadores específicos de CCDV, como D600 (Grasso & Reichert, 1989) e a nifedipina (Davidson et al., 1988).

Através destes estudos utilizando bloqueadores específicos, o envolvimento de CCDV do tipo L e do tipo T (Grasso & Reichert, 1989; Davidson et al., 1988; Wassermann et al., 1992a) na ação do FSH nas células de Sertoli foi evidenciado. Recentemente foi observado o envolvimento de canais tipo N na modulação da secreção de proteínas estimuladas por FSH nestas mesmas células (Taranta et al., 1997).

A testosterona e compostos relacionados como dihidrotestosterona (DHT) e R1881 promovem, em células de Sertoli, um rápido (20-30s) e transitório aumento nos níveis de cálcio intracelular quando aplicados exogenamente. Este rápido aumento dos níveis de cálcio é inibido pelo uso de verapamil (Lyng, et al., 2000).

Leite e colaboradores (1999) demonstraram que a testosterona possui uma ação estimulatória na captação de  $^{45}\text{Ca}^{++}$  em células de Sertoli de testículos em vários estágios de maturação (20-60 dias de idade). A testosterona promove, também, nestas células uma imediata e transitória despolarização dependente da dose. O efeito despolarizante deste hormônio aponta para uma alta especificidade da testosterona pelo receptor na membrana plasmática de células de Sertoli sugerindo um efeito rápido e provavelmente não-genômico, envolvendo canais de cálcio dependentes da voltagem e o fechamento de canais de  $\text{K}^+$  dependentes de ATP.

Em células de Sertoli o retinol estimula o transporte de aminoácidos através de mecanismos que envolvem CCDV (Wassermann et al., 1993). Nestas mesmas células, o retinol aumenta, muito rapidamente (20s) a captação de  $^{45}\text{Ca}^{++}$  e esta ação é parcialmente bloqueada por verapamil (Wassermann et al., 1995).

D'Agostino e colaboradores em 1992, estudando os CCDV, em células de Sertoli, verificaram que o influxo de cálcio nestas células é mediado por CCDV tipo L e N. Buscando evidências do papel fisiológico destes canais em testículos de ratos imaturos, estes autores descreveram que canais de  $\text{Ca}^{++}$  do tipo N modulam a secreção de proteínas em cultura de células de Sertoli de ratos.

O efeito estimulatório, não genômico, promovido pela  $1,25(\text{OH})_2\text{vitaminaD}_3$  no transporte duodenal de cálcio é inibido pelo quelante de cálcio extracelular EGTA e pelo bloqueio de CCDV. Estes resultados mostram que este efeito estimulatório é dependente do influxo de cálcio extracelular através de CCDV (Boland & Norman, 1990).

O cálcio é o primeiro mensageiro para os efeitos rápidos do  $\text{T}_3$  na membrana plasmática, e a captação de cálcio proveniente do meio extracelular é aparentemente a primeira resposta metabólica gerada pela interação deste hormônio com o sítio na membrana plasmática. O  $\text{T}_3$  produz um aumento na captação de  $^{45}\text{Ca}^{++}$  em vários tecidos e este efeito é rápido e transitório. Vários efeitos rápidos promovidos pelo  $\text{T}_3$  como o aumento da captação de açúcar, da concentração de  $\text{AMP}_c$  são precedidos pelo aumento da captação de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular (Segal, 1990).

Novos mecanismos modulatórios sugerem que correntes de cálcio podem influenciar outros íons. A presença de correntes de  $\text{Cl}^-$  dependentes de  $\text{Ca}^{++}$  e de correntes de  $\text{K}^+$  dependentes de  $\text{Ca}^{++}$  foram caracterizados em vários tecidos (Marty et al., 1984; Cobbett, et al., 1987; Taleb, et al., 1988).

O hormônio  $\text{T}_3$  produz em células de Sertoli um aumento da captação do aminoácido  $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$  e um efeito hiperpolarizante imediato na membrana plasmática destas células (Silva et al., 2001). A caracterização de correntes de  $\text{Cl}^-$  dependentes de  $\text{Ca}^{++}$  (Lalevée & Joffre, 1999) e de CCDV do tipo T em células de Sertoli de ratos imaturos (Wassermann et al., 1992a; Lalevée et al., 1997) nos leva a pensar que o íon cálcio possa estar envolvido neste efeito rápido mediado pelo  $\text{T}_3$  nestas células.

Silva e colaboradores (2001) propõem um mecanismo modulatório envolvendo correntes de  $\text{K}^+$  dependentes de  $\text{Ca}^{++}$  e/ou  $\text{Cl}^-$  dependentes de  $\text{Ca}^{++}$ , sugerindo que o influxo de cálcio pode ser influenciado por ambos os íons, sinalizando, assim, vias que modulem o transporte de aminoácidos. Todos estes dados apontam para o importante envolvimento do cálcio e de canais de  $\text{Ca}^{++}$  dependentes da voltagem no mecanismo de ação do hormônio  $\text{T}_3$ .

## 1.6. Canais de Potássio ( $K^+$ )

Os canais de  $K^+$  pertencem a uma família de proteínas de membrana. Estes canais desempenham papel fundamental em uma variedade de processos fisiológicos, incluindo regulação da velocidade cardíaca, contração muscular, liberação de neurotransmissores, excitabilidade neuronal, secreção de insulina, transporte epitelial de eletrólitos, regulação do volume e proliferação celular. Uma grande variedade de canais de  $K^+$  estão envolvidos nestes processos (Wickenden, 2002).

De fato, estes canais são os mais numerosos e abundantes e com maior diversidade se comparados aos demais canais iônicos. Muitos estudos têm se dirigido para a clonagem e caracterização de canais de  $K^+$  em mamíferos. São datados mais de 80 genes relacionados a estes canais.

Estudos têm demonstrado a presença de diversos tipos de canais de  $K^+$  que são sensíveis a neurotransmissores, hormônios, toxinas e fármacos (Wickenden, 2002). Devido a enorme diversidade de canais de  $K^+$ , o enfoque deste trabalho será dado às três principais classes destes canais: canais de  $K^+$  dependentes da voltagem; canais de  $K^+$  ativados por  $Ca^{++}$  e canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP.

### 1.6.1. Canais de $K^+$ Sensíveis à Voltagem

Os canais de  $K^+$  sensíveis à voltagem são responsáveis pelo controle do potencial de membrana e da excitabilidade celular. Mudanças no potencial de membrana promovem a ativação destes canais. Estes canais são abertos em resposta a uma despolarização da membrana, sendo, portanto, importantes para a repolarização da célula. Estes canais foram primeiramente descritos em linfócitos T há quase duas décadas atrás. Nestas células eles participam do processo de ativação, proliferação e síntese de interleucinas (Beeton et al., 2001; Wickenden, 2002).

### 1.6.2. Canais de K<sup>+</sup> Sensíveis ao ATP (K<sub>ATP</sub>)

A principal característica dos canais de K<sub>ATP</sub> é o fato de serem controlados pelos níveis citoplasmáticos de ATP. Desta forma, a função deste canal está estreitamente relacionada com o estado metabólico das células. Aumento nas concentrações citoplasmáticas de ATP promovem o fechamento destes canais (Wickenden, 2002).

São encontrados em células do miocárdio, células  $\beta$  do pâncreas, em músculo esquelético e liso, e em outros tecidos endócrinos e em algumas regiões do SNC (Edwards & Weston, 1993). Vários tipos de canais de K<sub>ATP</sub> são caracterizados com uma variabilidade na condutância e na concentração de ATP necessária para a inibição da atividade do canal (Ashcroft & Ashcroft, 1990).

O principal fator de regulação do canal K<sub>ATP</sub> é a concentração de ATP intracelular, porém a atividade deste canal pode ser modulada por fosforilação e pelo pH intracelular. Em geral, a ativação da proteína quinase A estimula a abertura do canal. A sensibilidade deste canal ao ATP ocorre dentro de níveis fisiológicos (10 –100  $\mu$ M). O ATP pode influenciar a condutância de outros tipos de canais de K<sup>+</sup>, através de um sítio de fosforilação. Além deste sítio, o canal apresenta um segundo sítio para ligação de ATP; um sítio regulatório que influencia no estado de abertura do canal (Edwards & Weston, 1993).

Os canais K<sub>ATP</sub> foram primeiramente descritos no coração (Noma, 1983) onde estão sendo estudados principalmente na análise de arritmias cardíacas. O estado de isquemia leva a ativação dos canais de K<sub>ATP</sub>, e desta forma estes seriam responsáveis pela geração de potenciais de ação curtos (Weiss, et al., 1992). Também tem se observado que estes canais estão envolvidos na função de marcapasso nas células do nodo sino atrial (Han et al., 1996).

A função melhor caracterizada destes canais em tecido endócrino ocorre nas células  $\beta$  do pâncreas, onde foi avaliada intensamente a participação do canal K<sub>ATP</sub> na função de secreção de insulina estimulada pela glicose. Foi proposto o seguinte mecanismo: 1) aumento da glicose extracelular gera um aumento de [ATP]<sub>intra</sub> e conseqüentemente fechamento dos canais de K<sub>ATP</sub>; 2) sendo a resistência da membrana das células  $\beta$  muito alta, o fechamento de poucos canais K<sub>ATP</sub> produz um efeito pronunciado sobre o potencial de membrana, gerando assim uma despolarização; 3) esta despolarização aumenta o influxo de Ca<sup>++</sup> através dos

CCDV do tipo “L” que então, estimulam a secreção da insulina dos grânulos secretórios (Francini, et al., 1997).

As sulfoniluréias constituem uma classe de drogas que bloqueiam a atividade de canais de  $K_{ATP}$ . Boyd III (1988) descreveu que o receptor para sulfoniluréias é uma proteína intimamente associada a um canal de  $K_{ATP}$ . O metabolismo da glicose ou de aminoácidos, por um aumento na relação ATP/ADP, inibe o mesmo canal na superfície interna da membrana plasmática. A inibição do canal de  $K_{ATP}$  leva a despolarização da célula, abrindo canais de  $Ca^{++}$  dependentes da voltagem, e permitindo a entrada de  $Ca^{++}$  extracelular. A elevação do  $[Ca^{++}]$  citosólico livre determina a liberação de insulina. O aumento de níveis de AMPc na célula também, pode abrir os CCDV, incrementando o influxo de  $Ca^{++}$  para dentro da célula.

As sulfoniluréias mais utilizadas são a glibenclamida e a tolbutamida.

### 1.6.3. Canais de $K^+$ Sensíveis ao $Ca^{++}$ ( $K_{Ca}$ )

O influxo de cálcio para dentro das células tem uma variedade de conseqüências como a ativação de sistemas de segundos mensageiros, liberação de cálcio de estoques intracelulares, e abertura de canais iônicos dependentes do cálcio. Entre estes canais, encontram-se os canais de potássio sensíveis ao cálcio ( $K_{Ca}$ ).

As primeiras evidências que níveis aumentados de cálcio citosólico alterariam a permeabilidade da membrana ao potássio surgiram em 1958 pelo estudo de células sanguíneas por Gardos (1958). Atualmente sabe-se que uma variedade de células dispõe destes canais, onde inúmeros processos fisiológicos são por eles regulados. Recentemente a natureza molecular de muitos canais  $K_{Ca}$  foram identificadas.

Três grandes famílias de canais  $K_{Ca}$  são bem estabelecidas: canais de alta condutância, de condutância intermediária e de pequena condutância (Wickenden, 2002).

O primeiro grupo a ser descrito foi o canal de alta condutância. Estes canais são altamente sensíveis ao cálcio. A ativação destes canais é promovida pela despolarização da membrana e pela concentração de cálcio intracelular (Sah & Faber, 2002). Isto é, a despolarização de membrana e o influxo de  $Ca^{++}$  na célula, estão inter-relacionados. Uma



certa concentração de cálcio intracelular despolariza a célula ativando assim a abertura destes canais de  $K^+$  com um conseqüente efluxo de  $K^+$  e repolarização da célula.

### 1.7. Canais de Cloreto ( $Cl^-$ )

Canais aniônicos são proteínas de membrana que, através de um gradiente eletroquímico, permitem a difusão passiva de íons carregados negativamente. Apesar destes canais conduzirem vários ânions, eles são freqüentemente chamados de canais de cloreto ( $Cl^-$ ) devido ao fato deste ânion ser o mais abundante nos organismos.

Os canais de  $Cl^-$  podem ser encontrados tanto na membrana plasmática quanto em organelas citoplasmáticas. Na membrana plasmática, estes canais exercem funções que incluem regulação do volume celular, transporte transepitelial e regulação da excitabilidade elétrica da célula. Diferentemente de íons como o  $Ca^{++}$ , o  $Cl^-$  parece não exercer papel de mensageiro intracelular. A atividade destes canais pode ser modulada pela voltagem da membrana, pelo volume celular, pela ligação de moléculas sinalizadoras, por determinados íons, pela fosforilação de resíduos intracelulares por proteínas quinases, ou pelo ATP (Jentsch et al., 2002).

Estudos demonstram uma grande variedade de canais de  $Cl^-$  que diferem entre si quanto a condutância, seletividade e mecanismos regulatórios. Porém muitos destes canais ainda não foram bem estabelecidos. Três classes principais de canais de  $Cl^-$  são descritas:

- Família CLC (canais de  $Cl^-$ );
- Canais de cloreto reguladores da condutância de transmembrana na fibrose cística (tipo CFTR);
- Canais de cloreto ligados a receptores.

Outras classes de canais de cloreto como canais intracelulares de cloreto, canais de cloreto dependentes de  $Ca^{++}$ , também são reportadas, porém são menos caracterizadas que as

outras classes. Devido a grande diversidade e complexidade destes canais, nesta dissertação será feita uma breve explanação sobre as principais classes destes canais.

### 1.7.1. Família CLC de Canais de Cloreto

A família de canais de cloreto CLC divide-se, nos mamíferos, em nove diferentes subtipos. Muitos destes canais são modulados pela voltagem celular. Além da voltagem, vários destes canais são adicionalmente modulados por ânions, e pelo pH. Somente poucos estudos descrevem uma regulação destes canais por mensageiros intracelulares ou proteínas quinases.

*Tabela 1.1: Família CLC de canais de Cl<sup>-</sup> em mamíferos (Adaptada de Jentsch, et al., 2002).*

Canal	Expressão	Função
CLC-0		
CLC-1	Músculo esquelético	Estabilização da membrana plasmática
CLC-2	Geral	Transporte transepitelial (?), pH, regulação do volume celular
CLC-Ka	Rins, ouvido interno	Transporte transepitelial
CLC-Kb	Rins, ouvido interno	Transporte transepitelial
CLC-3	Geral	Acidificação de endossomos, vesículas sinápticas
CLC-4	Geral	?
CLC-5	Rim, intestino, fígado	Acidificação de endossomos
CLC-6	Geral	?
CLC-7	Geral	Acidificação de lisossomos, reabsorção de osteoclastos

### 1.7.2. Canais de Cloreto Tipo CFTR (Regulador da Condutância de Transmembrana na Fibrose Cística)

CFTR foi o primeiro canal aniônico a ser clonado. A atividade deste canal independe da voltagem e requer a presença de nucleotídeos trifosfato hidrolisáveis para exercer sua atividade, assim este canal também é conhecido como canal de Cl<sup>-</sup> ativado por AMP<sub>c</sub>. CFTR é ativado pelo ATP e pela fosforilação de proteínas quinases dependentes de AMP<sub>c</sub>. Sabe-se

que o ATP é hidrolizado durante a atividade deste canal, mas o mecanismo de relação entre esta hidrólise e a atividade deste canal ainda não foi elucidado (Jentsch, et al., 2002).

CFTR é expresso na membrana apical de vários epitélios, principalmente no tecido epitelial do intestino, das glândulas secretórias, dos ductos biliares e do epidídimo. Esta classe de canal de cloreto exerce um papel crucial em diversos processos de transporte transepitelial (Jentsch, et al., 2002).

A ativação desta classe de canais parece ser um processo que envolve muitos passos como a ativação da proteína quinase C (PKC), proteína quinase A (PKA), e uma alta razão ATP/ADP para adquirir atividade máxima.

### 1.7.3. Canais de Cloreto Ligados a Receptores

Os receptores nicotínicos da acetilcolina, os receptores do ácido gama-amino-butírico (GABA) e da glicina pertencem a uma família de receptores ligados a canais iônicos. A ligação destes neurotransmissores aos receptores específicos promove a abertura dos canais aniônicos acoplados a estes receptores. Este evento produz um influxo de  $\text{Cl}^-$ , no qual hiperpolariza a célula nervosa e assim inibe a atividade neuronal (Jentsch et al., 2002).

### 1.7.4. Canais de Cloreto Ativados pelo $\text{Ca}^{++}$

Existe uma grande diversidade molecular de canais de  $\text{Cl}^-$  ativados pelo  $\text{Ca}^{++}$  e esta diversidade está relacionada também com as diferentes condutâncias apresentadas por estes canais.

Os canais de  $\text{Cl}^-$  ativados pelo cálcio intracelular  $[\text{Ca}^{++}]_i$  são encontrados em muitos tipos celulares incluindo células epiteliais, neuronais, cardíacas, musculares e sanguíneas. Canais de  $\text{Cl}^-$  ativados por  $\text{Ca}^{++}$  intracelular foram caracterizados em células de Sertoli (Lalevée e Joffre, 1999).

Alguns canais de cloreto podem ser também dependentes do cálcio extracelular. Assim, a diversidade destes canais se dá também pela procedência do cálcio envolvido na ativação destes canais.

Dependendo do tipo celular o  $\text{Ca}^{++}$  pode ativar estes canais de cloreto pela interação direta com o canal ou pela fosforilação, dependente de  $\text{Ca}^{++}$ /calmodulina dos canais de cloreto na presença de ATP.

Além da ação do  $\text{Ca}^{++}$  na modulação de canais de  $\text{Cl}^-$ , foi estudado, também, a modulação de canais de  $\text{Ca}^{++}$  dependentes da voltagem pelo íon  $\text{Cl}^-$ . Garcia e colaboradores, em 1997 demonstraram em lactotróficos de ratos que o bloqueio de canais de  $\text{Cl}^-$  pelo uso do bloqueador 9-AC reduz a entrada de  $\text{Ca}^{++}$  nestas células. Várias hipóteses foram sugeridas para explicar o mecanismo pelo qual o íon cloreto afeta a condutância do  $\text{Ca}^{++}$ , mas a determinação do mecanismo no qual este evento acontece, ainda não foi devidamente elucidado.

Muitas das ações não-genômicas promovidas por hormônios esteróides são produzidas pela interação do hormônio em sítios na membrana plasmática, gerando assim, sinais intracelulares que modulam a atividade de diferentes canais iônicos. Valverde e colaboradores (2002) descreveram que a modulação de canais de cloreto dependentes da voltagem constitui um exemplo de efeitos rápidos promovidos por estrógenos.

## 1.8. Objetivos

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar o mecanismo de ação do  $T_3$  na regulação do transporte do aminoácido modelo MeAIB-  $^{14}C$ , em testículos de ratos imaturos. Para atingir este objetivo foram analisados os seguintes objetivos específicos:

- O envolvimento do  $Ca^{++}$  extracelular no transporte de aminoácidos em condições basais e na presença de  $T_3$ .
- O envolvimento de canais de  $Ca^{++}$  dependentes da voltagem, no transporte de aminoácidos em condições basais e na presença de  $T_3$ , utilizando o verapamil como bloqueador destes canais.
- O envolvimento de  $Ca^{++}$  proveniente de estoques intracelulares no transporte de aminoácidos em condições basais e na presença de  $T_3$ .
- O envolvimento de canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP no transporte de aminoácidos em condições basais e na presença de  $T_3$ , utilizando a tolbutamida como bloqueador específico destes canais.
- O envolvimento de canais de  $Cl^-$  no transporte de aminoácidos em condições basais e na presença de  $T_3$ , utilizando o ácido carboxílico 9-antraceno como bloqueador específico destes canais.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

#### 2.1.1. Soluções Utilizadas

##### 2.1.1.1. Tampão Krebs-Ringer-bicarbonato (KRb)

Esta solução foi utilizada como meio de incubação em todos os experimentos, e era preparada imediatamente antes do experimento. O preparo da solução era feito a partir das seguintes soluções estoques:

*Tabela 2.1: Soluções estoque para o preparo do KRb.*

CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	2,50 mM
KH <sub>2</sub> .PO <sub>4</sub>	1,19 mM
MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,76 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25,00 mM
NaCl	118,00 mM
KCl	4,61 mM

No preparo da solução tampão foram colocados 2 mL de cada solução-estoque acrescentando-se o sulfato de magnésio e o cloreto de cálcio por último e completando o volume com 40 mL de água destilada. Para um volume maior multiplicava-se o volume de todos os componentes por um mesmo fator. Logo após, a solução era gaseificada com carbogênio (O<sub>2</sub>: CO<sub>2</sub>, 95 : 5, v/v) até que o pH atingisse o valor 7,4, monitorando através de um pH-metro. A solução assim obtida era mantida em gelo durante toda a preparação do experimento.

A tabela a seguir apresenta as concentrações iônicas obtidas no final da preparação de KRb e os valores encontrados nos líquidos intra e extracelulares (Long, 1961).

*Tabela 2.2: Concentrações iônicas do KRb, líquido intra e extracelular.*

Meio mEq/L	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>++</sup>	Mg <sup>++</sup>	HCO <sup>3-</sup>	HPO <sup>4-</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sup>4-</sup>
Extracelular	140-145	4-5	2,5	1,5	27	1,0	100	–
Intracelular	10	145-150	2,0	4,0	8	65-70	5-20	–
KRb	146	4,7	2,5	1,2	25	1,2	127	1,2

## 2.1.2. Substâncias Utilizadas

### 2.1.2.1. EGTA

O ácido N,N,N',N'-tetracético etilenoglicol – bis (â-aminoetil éter) (EGTA) foi utilizado como um agente quelante de cálcio extracelular. Esta droga, adquirida da Sigma, foi diluída em KRb. Utilizou-se as concentrações de 2 mM e 4 mM.

### 2.1.2.2. Verapamil

O verapamil é um fármaco com efeito antagonista específico sobre os canais de Ca<sup>++</sup> dependentes da voltagem (CCDV) do tipo “L”. Esta droga foi adquirida dos laboratórios Knoll em ampolas com concentração de 2,5 mg/mL e foi posteriormente diluída em KRb e utilizada nas concentrações finais de 50 µM e 100 µM.

### 2.1.2.3. BAPTA-AM

O 1,2-bis-(2-aminofenol) etano-N,N,N',N'-tetracético (BAPTA-AM) é um fármaco que atua como quelante de Ca<sup>++</sup> intracelular. Esta droga, obtida do laboratório Sigma, foi pesada e dissolvida em DMSO imediatamente antes de ser utilizada. As concentrações de BAPTA utilizadas foram 25 µM, 50 µM e 100 µM.

#### 2.1.2.4. Tolbutamida

A Tolbutamida atua como um bloqueador de canal de  $K^+$  dependente de ATP. Este fármaco, adquirido da Sigma, foi pesado e posteriormente dissolvido em NaOH 0,2 N. Utilizou-se concentrações de 100  $\mu$ M, 300  $\mu$ M, 600  $\mu$ M e 2,5 mM de tolbutamida.

#### 2.1.2.5. Ácido carboxílico 9-antraceno

O ácido carboxílico 9-antraceno é um fármaco que funciona como antagonista de canais de cloreto ( $Cl^-$ ). Esta droga, obtida pelo laboratório Sigma, foi pesada e dissolvida em etanol. Foram utilizadas concentrações de 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M do ácido carboxílico 9-antraceno.

#### 2.1.2.6. Hormônio 3,5,3'-triodo-L-tironina ( $T_3$ )

O hormônio, adquirido do laboratório Sigma, foi pesado e dissolvido em NaOH 0,02 N e posteriormente diluído em KRB em soluções de  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M,  $10^{-5}$  M.

Em todas as diluições dos fármacos utilizados neste trabalho, as concentrações finais dos respectivos solventes (Etanol, DMSO, NaOH) foram sempre inferiores ou iguais a 1%.

#### 2.1.2.7. Líquido de Cintilação

Para a contagem da radioatividade das alíquotas utilizou-se o líquido de cintilação Optiphase hifase III adquirido pela Sardi.

#### 2.1.2.8. Aminoácido MeAIB- $^{14}C$

Utilizou-se o aminoácido modelo  $\alpha$ - metilaminoisobutírico marcado com  $^{14}C$  ( $\alpha$ -MeAIB- $^{14}C$ ), com atividade específica de 50 mCi/mmol. Este foi obtido da Du Pont NEN Research Products. Era adicionado em cada amostra 0,2  $\mu$ Ci do aminoácido modelo



imediatamente antes do início da incubação nos grupos controle e tratado para a medida do transporte de aminoácido.

### 2.1.3. Equipamentos Utilizados

#### ▪ **Medidor de pH (Modelo DMPH-3 Digimed)**

Foi utilizado para a monitorização do pH em todas as soluções. Este aparelho era sempre calibrado antes do uso.

#### ▪ **Balança eletrônica (Sartori)**

Balança com precisão de 4 dígitos após a vírgula, era utilizada para a pesagem de drogas e gônadas.

#### ▪ **Incubador metabólico com agitação (Quimis)**

Este aparelho tem um sistema de agitação, termostato e é acoplado a um cilindro de carbogênio para manutenção de uma atmosfera de O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>, 95:5 v/v. O incubador foi utilizado em todos os experimentos.

#### ▪ **Espectrômetro de Cintilação (LKB modelo 1209 – Rack-Beta)**

Foi utilizado o espectrômetro de cintilação líquida, com eficiência de 85 a 90%, para contagem da radioatividade em cpm.

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Animais Experimentais

Foram utilizados ratos machos Wistar de 11 dias de idade todos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Para o controle da idade considerou-se o primeiro dia de vida o dia seguinte ao do nascimento. Os animais imaturos ainda em fase de aleitamento eram mantidos juntamente com as mães, em gaiolas plásticas até o momento do experimento. Os animais eram submetidos a um ciclo normal claro/escuro

(luzes acesas das 7 às 19 horas), com temperatura controlada em sala climatizada, ração padronizada e água “ad libitum”.

Todos os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos segundo as recomendações do Conselho de Medicina Veterinária (CMV) e do Colégio Brasileiro de experimentação animal (COBEA) (Protocolo 067/CEUA).

## 2.2.2. Procedimentos Experimentais

### 2.2.2.1. Transporte de MeAIB-<sup>14</sup>C em testículo

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os testículos removidos por incisão abdominal. A seguir, efetuou-se a limpeza das gônadas por dissecação do epidídimo e então os testículos foram pesados individualmente. Posteriormente procedeu-se a retirada da túnica albugínea e as gônadas foram incluídas no meio de incubação. Durante o tempo de obtenção dos testículos, estes foram mantidos em papel filtro embebido na solução tampão Krebs Ringer-bicarbonato (KRb) e acondicionados em placas de Petri mantidas em gelo (Silva, et al., 2001).

De cada animal um testículo foi tomado como controle (alternadamente direito e esquerdo) e o contralateral como tratado. Os testículos foram distribuídos em frascos contendo 1mL de KRb, em ausência (controle) ou presença de T<sub>3</sub> e/ou EGTA, e/ou BAPTA-AM, e/ou verapamil, e/ou tolbutamida, e/ou ácido carboxílico 9-antraceno nos grupos tratados e a seguir foram pré-incubados em um agitador metabólico a 34 °C, em uma atmosfera de carbogênio (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>, 95:5,v/v), durante 30 minutos.

Imediatamente após a pré-incubação, os testículos eram trocados para um meio igual ao da pré-incubação, porém acrescido do aminoácido modelo MeAIB-<sup>14</sup>C (0,2 µCi/mL) e então incubados por 60 minutos.

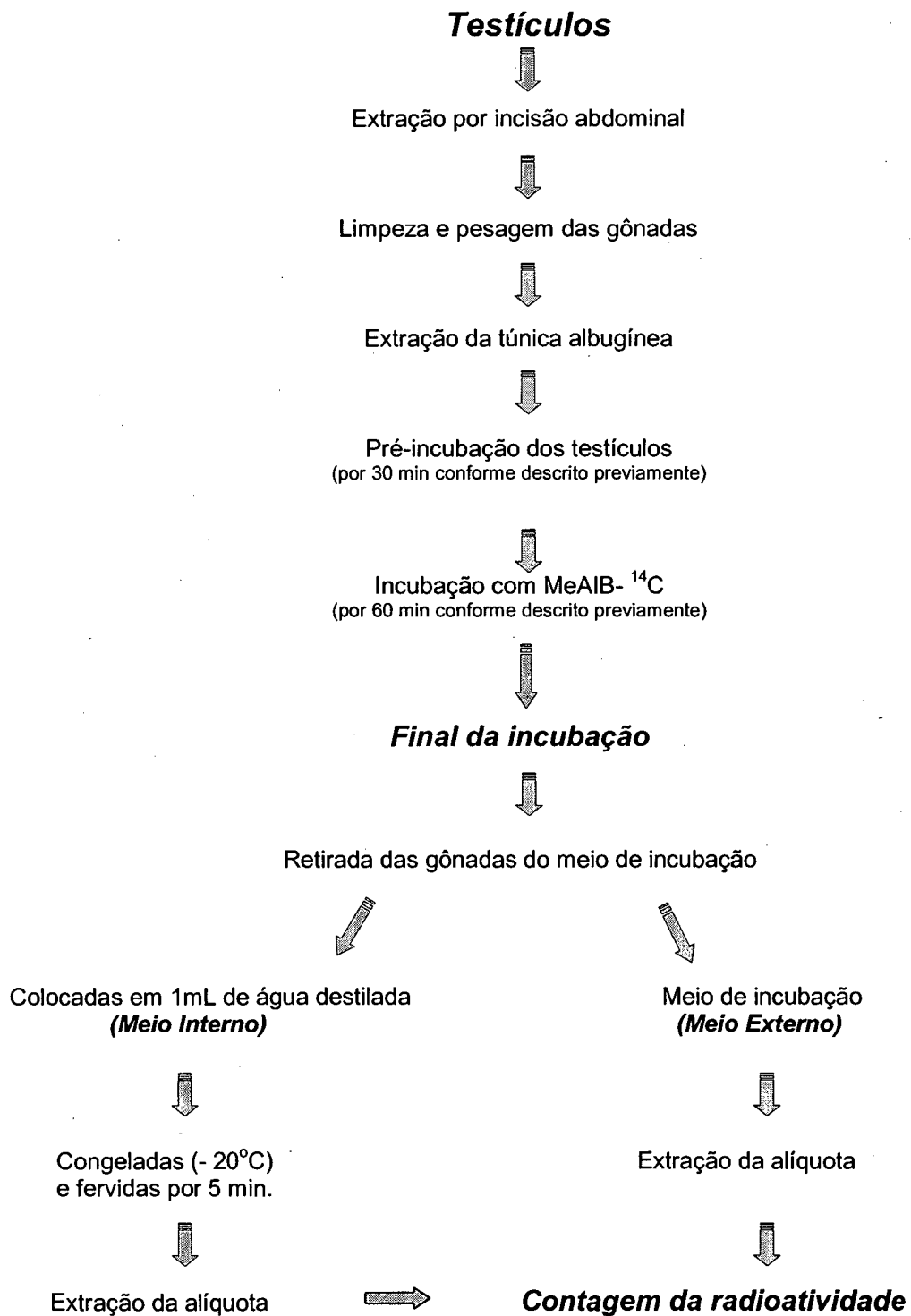
#### 2.2.2.1.1. Processamento das amostras

Após a incubação as gônadas foram retiradas do meio de incubação, secas em papel filtro umedecido em KRb gelado, para a remoção do excesso de aminoácido radioativo aderido à superfície do tecido, e transferidas para frascos com tampa hermética contendo 1 mL de água destilada.

Estes frascos foram congelados a 20 °C negativos e fervidos durante 5 minutos, com o objetivo de romper a membrana celular e obter o equilíbrio entre o meio intra e extracelular com a água adicionada.

Alíquotas de 25 µL do líquido tissular e do meio de incubação foram extraídas e transferidas para frascos contendo 3 mL de líquido de cintilação. A radioatividade das alíquotas foi determinada num espectrômetro de cintilação líquida LKB (Rack-Beta).

Os resultados foram expressos pela razão da radioatividade presente nos tecidos, pelo peso dos testículos, em função da radioatividade presente no meio de incubação, avaliada pelo número de contas por minuto (cpm) do líquido de incubação (T/M).



**Figura 2.1:** Representação esquemática da metodologia do transporte de aminoácidos.

### 2.2.3. Análise Estatística

Os resultados experimentais foram comparados estatisticamente, pelo teste *t* de Student, quando analisados dois grupos, e para mais de dois grupos foi utilizado a análise de variância de uma via (ANOVA) utilizando-se o programa GraphPAD INSTAT versão V 1.12a. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um “p” igual ou menor que 0.05 (SNEDECOR & COCKRAN, 1973).

### 3. RESULTADOS

O hormônio  $T_3$  modula vários processos metabólicos na célula, porém muitos destes eventos não estão diretamente relacionados a ações nucleares. Estes eventos, conhecidos como efeitos não-genômicos estão relacionados à interação do hormônio com sítios na membrana plasmática promovendo ações rápidas que vão desde a geração de sinais intracelulares que modulam a atividade de canais iônicos na membrana plasmática até a interação direta do hormônio com estes canais.

Um dos efeitos rápidos promovidos pelo  $T_3$  é o estímulo no transporte de aminoácidos em células de Sertoli. A captação do aminoácido MeAIB- $^{14}C$  pelo sistema "A" de transporte de aminoácidos é eletrogênico e responsivo ao potencial de membrana e desta forma dependente da atividade de canais iônicos presentes na membrana plasmática.

O presente trabalho tem por objetivo estudar o envolvimento de íons e canais iônicos no transporte de MeAIB- $^{14}C$  estimulado por  $T_3$  e desta forma elucidar o mecanismo de ação pelo qual o  $T_3$  promove o estímulo deste transporte.

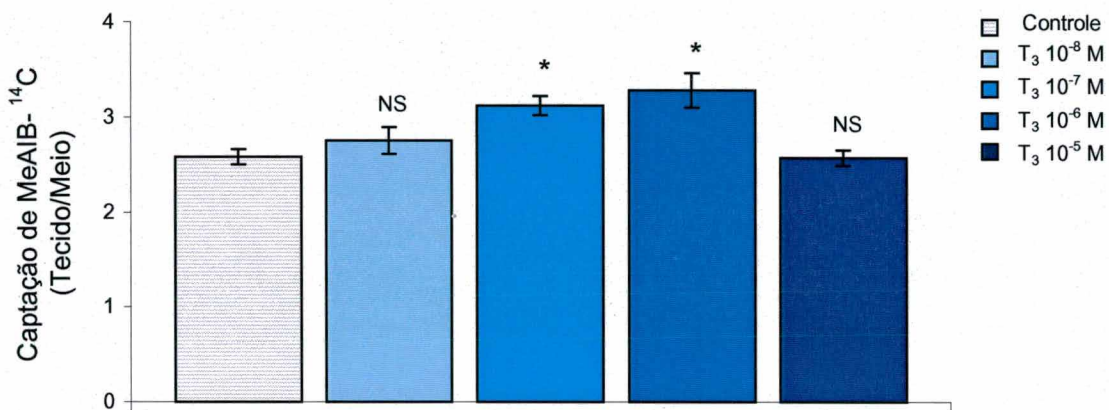
#### 3.1. Curva de Dose-Resposta do Hormônio $T_3$ no Transporte de MeAIB- $^{14}C$ em Testículos de Ratos Imaturos

Para estudar o efeito agudo do hormônio do 3,5,3'-triiodo-L-tironina ( $T_3$ ) no transporte do aminoácido modelo MeAIB- $^{14}C$  em testículos de ratos imaturos foram utilizadas concentrações de  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M deste hormônio. Observou-se que o  $T_3$  promoveu um efeito estimulatório na captação deste aminoácido nas concentrações de  $10^{-7}$  e  $10^{-6}$  M e este efeito não foi observado nas concentrações de  $10^{-8}$  e  $10^{-5}$  M.

**Tabela 3.1:** Ação do hormônio  $T_3$ , em diferentes concentrações, no transporte de  $MeAIB-^{14}C$ .

Concentração de $T_3$	Captação de $MeAIB-^{14}C$ (T/M)
0 M (Controle)	$2,58 \pm 0,08$
$10^{-8}$ M	$2,75 \pm 0,14$
$10^{-7}$ M	$3,12 \pm 0,10^*$
$10^{-6}$ M	$3,28 \pm 0,18^*$
$10^{-5}$ M	$2,57 \pm 0,08$

(Valores da Figura 3.1) (Média  $\pm$  EPM); \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle.



**Figura 3.1:** Curva dose-resposta do hormônio  $T_3$  no transporte de  $MeAIB-^{14}C$  em testículos de ratos imaturos. Pré-incubação: 30 min, Incubação: 60 min. Controle (n=15);  $T_3 10^{-8}$  M (n=4);  $T_3 10^{-7}$  M (n=10);  $T_3 10^{-6}$  M (n=7);  $T_3 10^{-5}$  M (n=8); \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle.

Para os estudos da influência de íons e canais iônicos no transporte basal e estimulado por  $T_3$ , utilizou-se a concentração de  $10^{-7}$  M do hormônio em todos os experimentos.

### 3.2. Influência do $Ca^{++}$ Extracelular no Transporte de $MeAIB-^{14}C$ Basal e Estimulado por $T_3$

O cálcio é um importante sinalizador de diversos eventos celulares. Os níveis citosólicos deste íon podem ser aumentados pelo influxo de cálcio extracelular através da membrana plasmática ou pela liberação de cálcio dos estoques provenientes de

compartimentos intracelulares. Para o estudo da influência do  $\text{Ca}^{++}$  extracelular no transporte de aminoácidos basal e estimulado por  $\text{T}_3$   $10^{-7}$  M foi utilizado o quelante de cálcio EGTA.

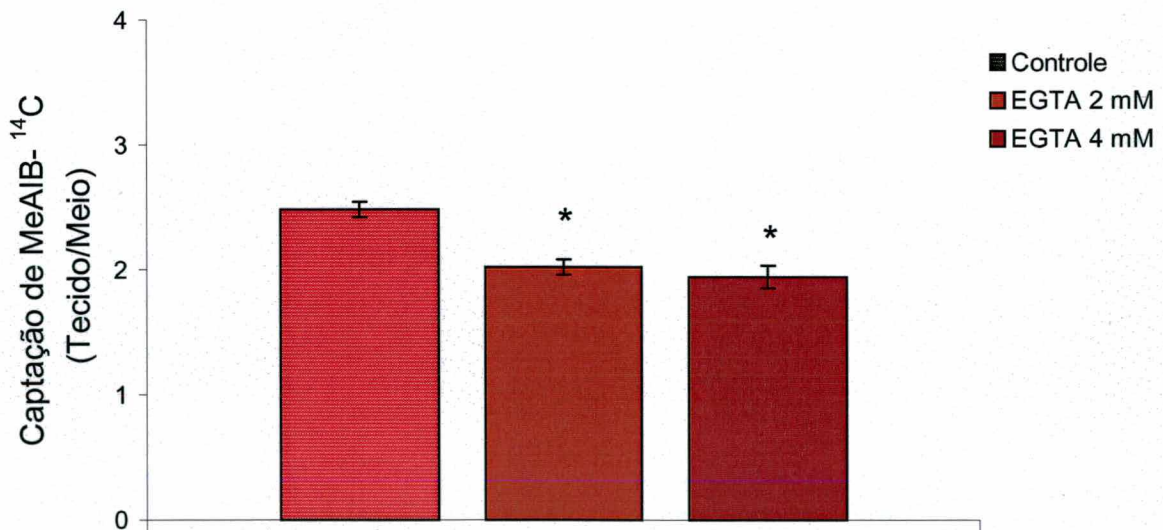
### 3.2.1. Efeito do EGTA no Transporte Basal de Aminoácidos

A Figura 3.2 apresenta o efeito de EGTA (2 mM e 4 mM) na captação de  $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$ . Verificou-se que este quelante da  $\text{Ca}^{++}$  extracelular diminuiu significativamente o transporte de aminoácidos em relação ao grupo controle em ambas as concentrações utilizadas. A análise estatística indicou que não há diferença significativa entre as concentrações utilizadas.

**Tabela 3.2:** Efeito do EGTA no transporte basal de  $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$  em diferentes concentrações.

Concentração de EGTA	Captação de $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$ (T/M)
0 mM (Controle)	$2,48 \pm 0,06$
2 mM	$2,02 \pm 0,06^*$
4 mM	$1,94 \pm 0,09^*$

(Valores da Figura 3.2) (Média  $\pm$  EPM); \* $p \leq 0,05$  em relação ao controle.



**Figura 3.2:** Efeito do EGTA (2 mM e 4 mM) no transporte basal de  $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$  em testículos de ratos imaturos. Pré-incubação: 30 min, Incubação: 60 min. Controle (n=5); EGTA 2 mM (n=7); EGTA 4 mM (n=6); \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle.



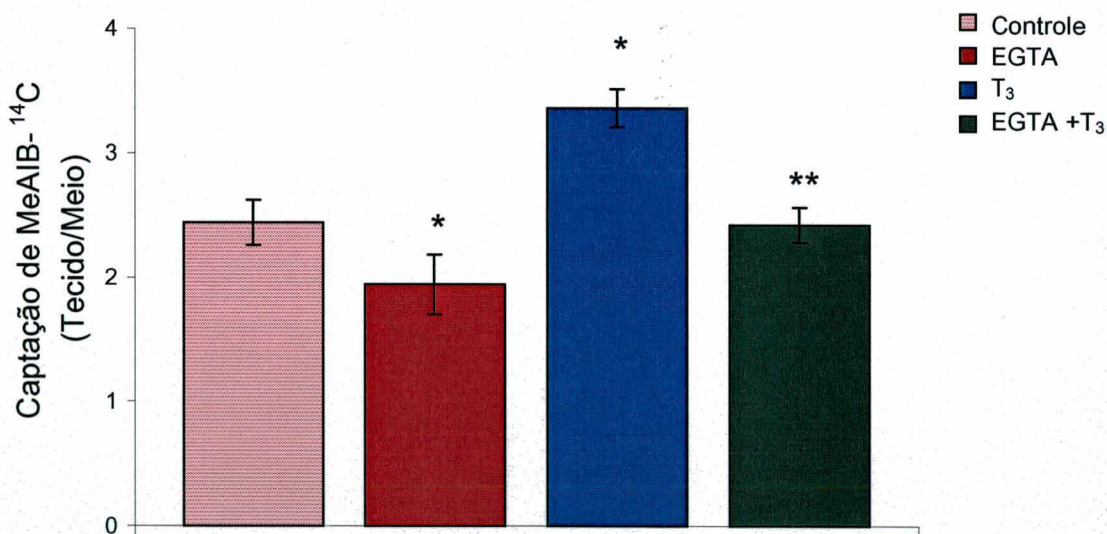
### 3.2.2. Efeito do EGTA (4 mM) na Ação Estimulatória do T<sub>3</sub> no Transporte de Aminoácido

A depleção do íon cálcio do meio extracelular através do uso de EGTA (4 mM) promoveu uma redução significativa do efeito estimulatório do hormônio T<sub>3</sub> no transporte do aminoácido MeAIB-<sup>14</sup>C.

**Tabela 3.3:** Efeito do EGTA na ação estimulatória do T<sub>3</sub> na captação de MeAIB-<sup>14</sup>C.

Concentração	Captação de MeAIB- <sup>14</sup> C (T/M)
0 M (Controle)	2,44 ± 0,18
EGTA 4 mM	1,94 ± 0,14*
T <sub>3</sub> 10 <sup>-7</sup> M	3,36 ± 0,15*
EGTA + T <sub>3</sub>	2,42 ± 0,14**

(Valores da Figura 3.3) (Média ± EPM); \*p ≤ 0,05 em relação ao controle; \*\*p ≤ 0,05 em relação ao grupo tratado com 10<sup>-7</sup> M T<sub>3</sub>.



**Figura 3.3:** Efeito de 4 mM de EGTA na ação estimulatória do T<sub>3</sub> no transporte de MeAIB-<sup>14</sup>C em testículos de ratos imaturos. Pré-incubação: 30 min, Incubação: 60 min. Controle (n = 5); EGTA 4 mM (n = 6); T<sub>3</sub> (n = 4); T<sub>3</sub> + EGTA (n = 6); \*p ≤ 0,05 em relação ao grupo controle; \*\*p ≤ 0,05 em relação ao grupo tratado com T<sub>3</sub>.

### 3.3. Influência de Canais de $\text{Ca}^{++}$ Dependentes da Voltagem (CCDV) no Transporte de MeAIB- $^{14}\text{C}$ Basal e Estimulado por $\text{T}_3$

O aumento do influxo de cálcio através dos canais de  $\text{Ca}^{++}$  presentes na membrana plasmática das células muitas vezes é decorrente de uma estimulação hormonal.

Para o estudo da influência dos canais de  $\text{Ca}^{++}$  dependentes da voltagem no transporte de aminoácidos foi utilizado o verapamil, um bloqueador específico de CCDV tipo "L".

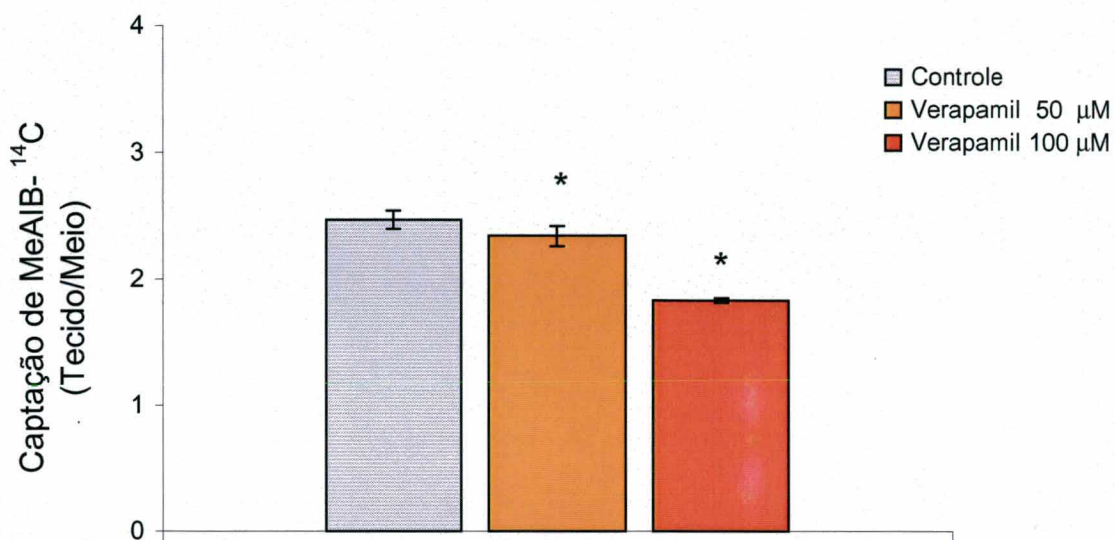
#### 3.3.1. Efeito do Verapamil no Transporte Basal de Aminoácido

A Figura 3.4 apresenta o efeito do verapamil, em diferentes concentrações, na captação basal do aminoácido neutro MeAIB- $^{14}\text{C}$ . Verificou-se que o bloqueio dos canais de  $\text{Ca}^{++}$  dependentes da voltagem pelo verapamil (50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ ) promoveu uma diminuição significativa no transporte de aminoácidos, em relação ao grupo controle, e este efeito foi evidente nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$ .

*Tabela 3.4: Efeito do verapamil na captação basal de MeAIB- $^{14}\text{C}$ .*

Concentração de Verapamil	Captação de MeAIB- $^{14}\text{C}$ (T/M)
0 $\mu\text{M}$ (Controle)	2,47 $\pm$ 0,07
50 $\mu\text{M}$	2,34 $\pm$ 0,08*
100 $\mu\text{M}$	1,83 $\pm$ 0,02*

(Valores da Figura 3.4) (Média  $\pm$  EPM); \*p < 0,05 em relação ao grupo controle.



**Figura 3.4:** Efeito do verapamil no transporte basal de MeAIB-<sup>14</sup>C em testículos de ratos imaturos. Pré-incubação: 30 min, Incubação: 60 min. Controle (n= 16); Verapamil 50 µM (n= 8); Verapamil 100 µM (n= 11); \*p≤0,05 em relação ao grupo controle.

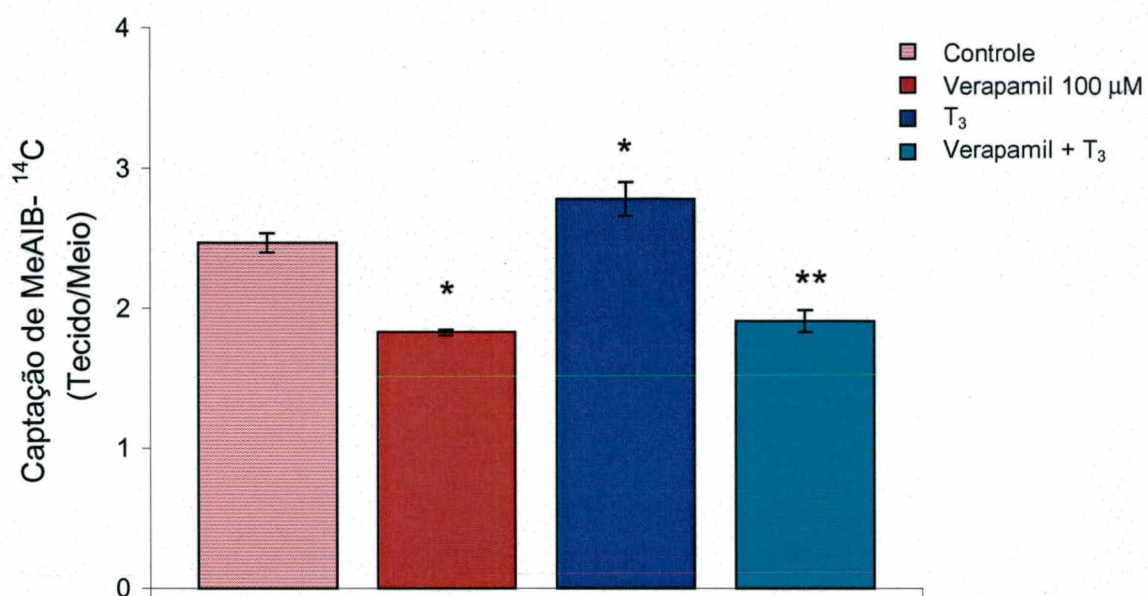
### 3.3.2. Efeito do Verapamil (100 µM) na Ação Estimulatória do T<sub>3</sub> no Transporte de Aminoácido

Bloqueando-se a entrada de cálcio pelos canais de Ca<sup>++</sup> dependentes da voltagem com o verapamil (100 µM) observou-se uma redução significativa do efeito estimulatório promovido pelo hormônio T<sub>3</sub> no transporte de MeAIB-<sup>14</sup>C.

**Tabela 3.5:** Efeito do verapamil sobre a ação estimulatória do T<sub>3</sub> na captação de MeAIB-<sup>14</sup>C.

Concentração	Captação de MeAIB- <sup>14</sup> C (T/M)
0 M (Controle)	2,47 ± 0,07
Verapamil 100 µM	1,83 ± 0,02*
T <sub>3</sub> 10 <sup>-7</sup> M	2,78 ± 0,12*
Verapamil + T <sub>3</sub>	1,91 ± 0,08**

(Valores da Figura 3.5) (Média ± EPM); \*p≤ 0,05 em relação ao grupo controle; \*\*p≤0,05 em relação ao grupo tratado com 10<sup>-7</sup> M T<sub>3</sub>.



**Figura 3.5:** Efeito de 100 μM de verapamil na ação estimulatória do T<sub>3</sub> no transporte de MeAIB-<sup>14</sup>C em testículos de ratos imaturos. Pré-incubação: 30 min, Incubação: 60 min. Controle (n= 16); Verapamil 100 μM (n= 11); T<sub>3</sub> (n= 8); T<sub>3</sub> + Verapamil (n= 7); \*p ≤ 0,05 em relação ao grupo controle; \*\*p ≤ 0,05 em relação ao grupo tratado com T<sub>3</sub>.

### 3.4. Influência do Ca<sup>++</sup> Intracelular no Transporte de MeAIB-<sup>14</sup>C Basal e Estimulado por T<sub>3</sub>

Para verificar a participação do cálcio intracelular ([Ca<sup>++</sup>]<sub>i</sub>) sobre o transporte basal e estimulado por T<sub>3</sub> do aminoácido MeAIB-<sup>14</sup>C, foi utilizado o BAPTA-AM, um quelante de [Ca<sup>++</sup>]<sub>i</sub>. Os testículos foram pré-incubados por 45 minutos com BAPTA-AM. Por ser uma molécula esterificada, este quelante difunde-se através da membrana plasmática durante o período de pré-incubação. No interior da célula o BAPTA é desesterificado por estereases teciduais e desta forma permanece dentro da célula, apresentando sítios expostos capazes de quelar o cálcio citosólico e dos estoques intracelulares.

#### 3.4.1. Efeito do BAPTA no Transporte Basal de Aminoácido

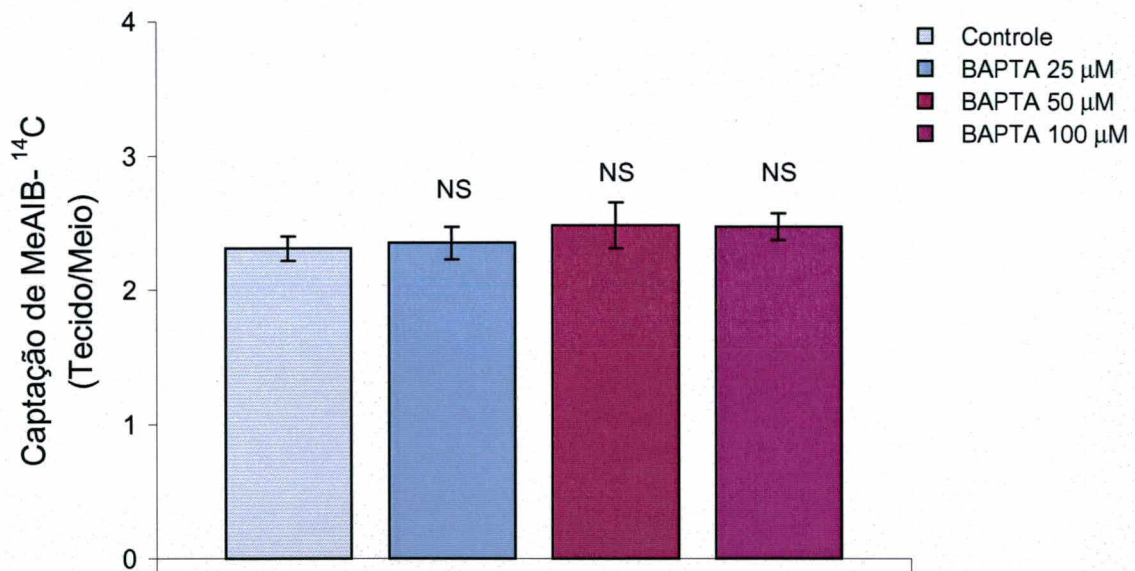
A Figura 3.6 apresenta o efeito do BAPTA, em diferentes concentrações, na captação basal do aminoácido neutro MeAIB-<sup>14</sup>C. Verificou-se que este quelante de [Ca<sup>++</sup>]<sub>i</sub> não alterou

significativamente o transporte basal de aminoácidos, em relação ao controle, em nenhuma das doses utilizadas.

**Tabela 3.6:** Efeito do BAPTA-AM na captação basal de MeAIB-<sup>14</sup>C.

Concentração de BAPTA-AM	Captação de MeAIB- <sup>14</sup> C (T/M)
0 M (Controle)	2,31 ± 0,09
25 µM	2,35 ± 0,12 NS
50 µM	2,48 ± 0,17 NS
100 µM	2,47 ± 0,10 NS

(Valores da Figura 3.6) (Média ± EPM); NS (não significativo).



**Figura 3.6:** Efeito do BAPTA-AM no transporte basal de MeAIB-<sup>14</sup>C em testículos de ratos imaturos. Pré-incubação: 45 min, Incubação: 60 min; NS (não significativo). Controle (n= 6); BAPTA 25 µM (n= 4); BAPTA 50 µM (n= 4); BAPTA 100 µM (n= 6).

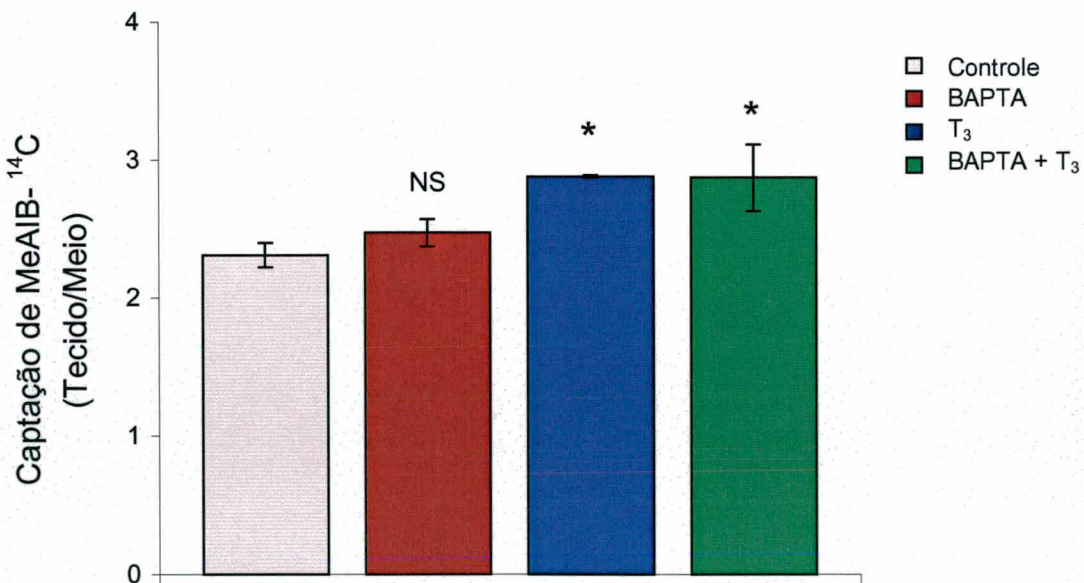
### 3.4.2. Efeito do BAPTA-AM (100 $\mu$ M) na Ação Estimulatória do $T_3$ ( $10^{-7}$ M) no Transporte de Aminoácidos

A concentração de  $Ca^{++}$  intracelular é controlada pela captação e liberação deste íon pela célula. Desta forma os estoques intracelulares de cálcio contribuem para a manutenção do gradiente iônico deste íon na célula. A depleção dos estoques citoplasmáticos de  $Ca^{++}$  com o uso de BAPTA (100  $\mu$ M) não impediu o efeito estimulatório do hormônio  $T_3$  sobre transporte do aminoácido MeAIB- $^{14}C$ .

**Tabela 3.7:** Efeito do BAPTA-AM na ação estimulatória do  $T_3$  na captação de MeAIB- $^{14}C$ .

Concentração	Captação de MeAIB- $^{14}C$ (T/M)
0 M (Controle)	2,31 $\pm$ 0,09
BAPTA 100 $\mu$ M	2,47 $\pm$ 0,10 NS
$T_3$ $10^{-7}$ M	2,88 $\pm$ 0,01*
BAPTA + $T_3$	2,87 $\pm$ 0,24*

(Valores da Figura 3.7.) (Média  $\pm$  EPM); \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle; NS (não significativo).



**Figura 3.7:** Efeito do BAPTA-AM (100  $\mu$ M) na ação estimulatória do  $T_3$  no transporte de MeAIB- $^{14}C$  em testículos de ratos imaturos. Pré-incubação: 45 min, Incubação: 60 min. Controle (n= 6); BAPTA 100  $\mu$ M (n= 6);  $T_3$  (n= 4);  $T_3$  + BAPTA (n= 3); \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle; NS (não significativo).

### 3.5. Influência de Canais de Potássio ( $K^+$ ) Sensíveis ao ATP no Transporte de MeAIB- $^{14}C$ Basal e Estimulado por $T_3$

O potencial de membrana das células é controlado principalmente pelos níveis intracelulares de  $K^+$ . Portanto, a abertura e fechamento de canais de  $K^+$  presentes na membrana plasmática das células promovem alterações consideráveis na fisiologia celular.

Para verificar a participação do  $K^+$  no transporte do aminoácido MeAIB- $^{14}C$  basal e estimulado por  $T_3$ , verificamos a influência de canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP neste transporte. Para este estudo utilizou-se a tolbutamida, um bloqueador específico destes canais citados acima.

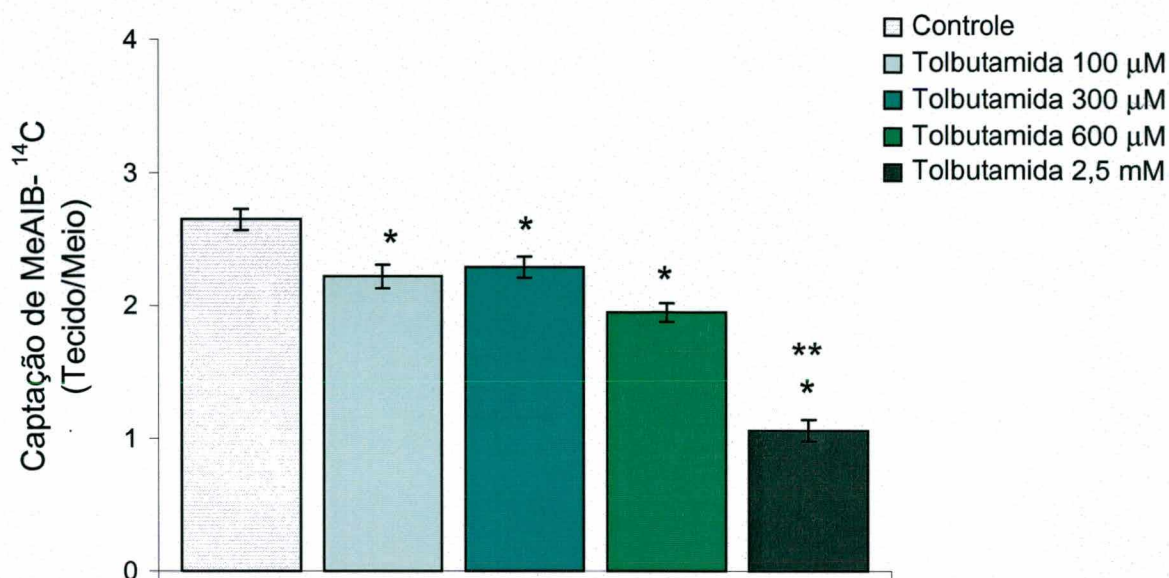
#### 3.5.1. Efeito da Tolbutamida no Transporte Basal de Aminoácido

A Figura 3.8 apresenta o efeito da tolbutamida, em diferentes concentrações, na captação basal do aminoácido neutro MeAIB- $^{14}C$ . Verificou-se que este bloqueador promoveu uma diminuição significativa do transporte basal de aminoácidos, em relação ao controle, e este efeito foi observado em todas as concentrações utilizadas. A dose de 2,5 mM da tolbutamida também produziu uma diminuição significativamente acentuada em relação às outras concentrações utilizadas.

**Tabela 3.8:** Efeito da tolbutamida sobre a captação basal de MeAIB- $^{14}C$ .

Concentração de Tolbutamida	Captação de MeAIB- $^{14}C$ (T/M)
0 $\mu$ M (Controle)	2,65 $\pm$ 0,08
100 $\mu$ M	2,22 $\pm$ 0,09*
300 $\mu$ M	2,29 $\pm$ 0,08*
600 $\mu$ M	1,95 $\pm$ 0,07*
2,5 mM	1,06 $\pm$ 0,08* **

(Valores da Figura 3.8) (Média  $\pm$  EPM); \*p < 0,05 em relação ao grupo controle; \*\*p < 0,05 em relação aos grupos de 100, 300 e 600  $\mu$ M.



**Figura 3.8:** Efeito da tolbutamida na captação basal do transporte de MeAIB-<sup>14</sup>C em testículos de ratos imaturos. Pré-incubação: 30 min, Incubação: 60 min. Controle (n= 11); Tolbutamida 100 µM (n= 3); Tolbutamida 300 µM (n= 5); Tolbutamida 600 µM (n= 4); Tolbutamida 2,5 mM (n= 4); \*p≤ 0,05 em relação ao grupo controle, \*\*p≤ 0,05 em relação ao grupo tratado com T<sub>3</sub>.

### 3.5.2. Efeito da Tolbutamida (300 µM) na Ação Estimulatória do T<sub>3</sub> (10<sup>-7</sup> M) no Transporte de Aminoácidos

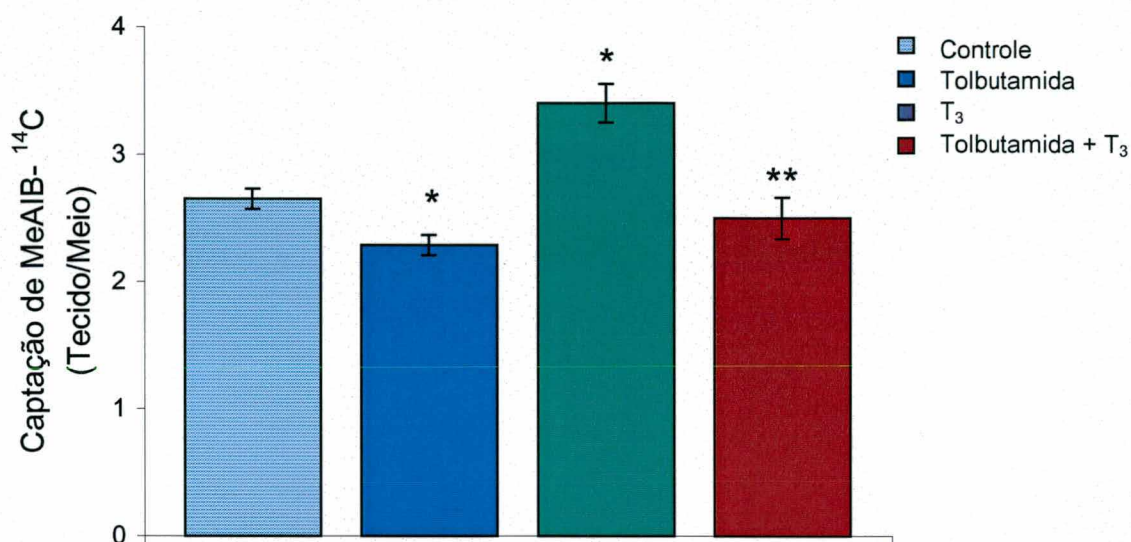
A redução da permeabilidade celular ao potássio através do bloqueio de canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP com tolbutamida (300 µM) diminuiu significativamente o efeito estimulatório do T<sub>3</sub> no transporte do aminoácido MeAIB-<sup>14</sup>C.

**Tabela 3.9:** Efeito da tolbutamida na ação estimulatória do T<sub>3</sub> na captação de MeAIB-<sup>14</sup>C.

Concentração	Captação de MeAIB- <sup>14</sup> C (T/M)
0 M (Controle)	2,65 ± 0,08
Tolbutamida 300 µM	2,29 ± 0,08*
T <sub>3</sub> 10 <sup>-7</sup> M	3,40 ± 0,15*
Tolbutamida + T <sub>3</sub>	2,50 ± 0,16**

(Valores da Figura 3.9) (Média ± EPM); \*p≤ 0,05 em relação ao grupo controle; \*\*p≤ 0,05 em relação ao grupo tratado com 10<sup>-7</sup>M T<sub>3</sub>.





**Figura 3.9:** Efeito da tolbutamida (300  $\mu\text{M}$ ) na ação estimulatória do  $\text{T}_3$  ( $10^{-7} \text{M}$ ) no transporte de  $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$  em testículos de ratos imaturos. Pré-incubação: 30 min, Incubação: 60 min. Controle ( $n=11$ ); Tolbutamida 300  $\mu\text{M}$  ( $n=5$ );  $\text{T}_3$  ( $n=3$ );  $\text{T}_3 + \text{Tolbutamida}$  ( $n=4$ ); \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle; \*\* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo tratado com  $\text{T}_3$ .

### 3.6. Influência de Canais de Cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) no Transporte de $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$ Basal e Estimulado por $\text{T}_3$

Para estudar a participação do  $\text{Cl}^-$  no transporte do aminoácido  $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$  basal e estimulado por  $\text{T}_3$ , verificamos a influência de canais de  $\text{Cl}^-$  neste sistema de transporte. Para este estudo utilizou-se o ácido carboxílico 9-antraceno (9-AC), um bloqueador específico de canais de cloreto.

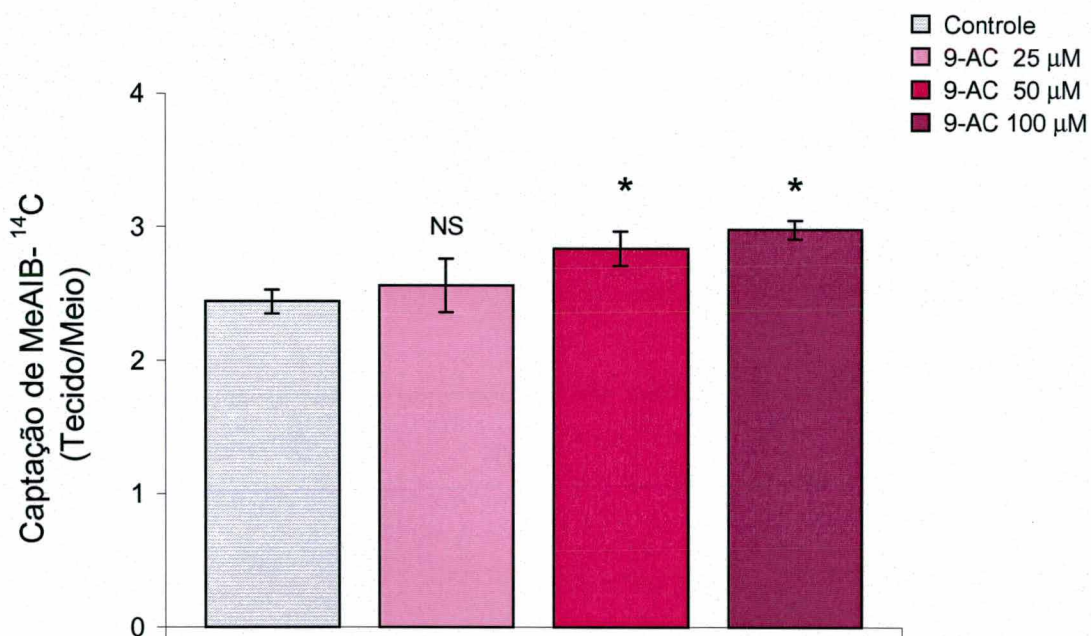
#### 3.6.1. Efeito do Ácido Carboxílico 9-Antraceno no Transporte Basal de Aminoácidos

A Figura 3.10 apresenta o efeito do ácido carboxílico 9-antraceno (9-AC), em diferentes concentrações, na captação basal do aminoácido neutro  $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$ . Verificou-se que 25  $\mu\text{M}$  deste bloqueador não apresentou alterações significativas no transporte basal de aminoácidos, em relação ao controle. No entanto, as concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$  aumentaram significativamente o transporte do aminoácido em relação ao controle.

**Tabela 3.10:** Efeito do bloqueador de canal de cloreto 9-AC na captação basal de MeAIB-<sup>14</sup>C.

Concentração do 9-AC	Captação de MeAIB- <sup>14</sup> C (T/M)
0 μM (Controle)	2,44 ± 0,09
25 μM	2,56 ± 0,20 NS
50 μM	2,84 ± 0,13*
100 μM	2,98 ± 0,07*

(Valores da Figura 3.10) (Média ± EPM); \*p ≤ 0,05 em relação ao grupo controle; NS (não significativo).



**Figura 3.10:** Efeito do 9-AC na captação basal do transporte de MeAIB-<sup>14</sup>C em testículos de ratos imaturos. Pré-incubação: 30 min, Incubação: 60 min. Controle (n= 9); 9-AC 25 μM (n= 4); 9-AC 50 μM (n= 7); 9-AC 100 μM (n= 7); \*p ≤ 0,05 em relação ao grupo controle; NS (não significativo).

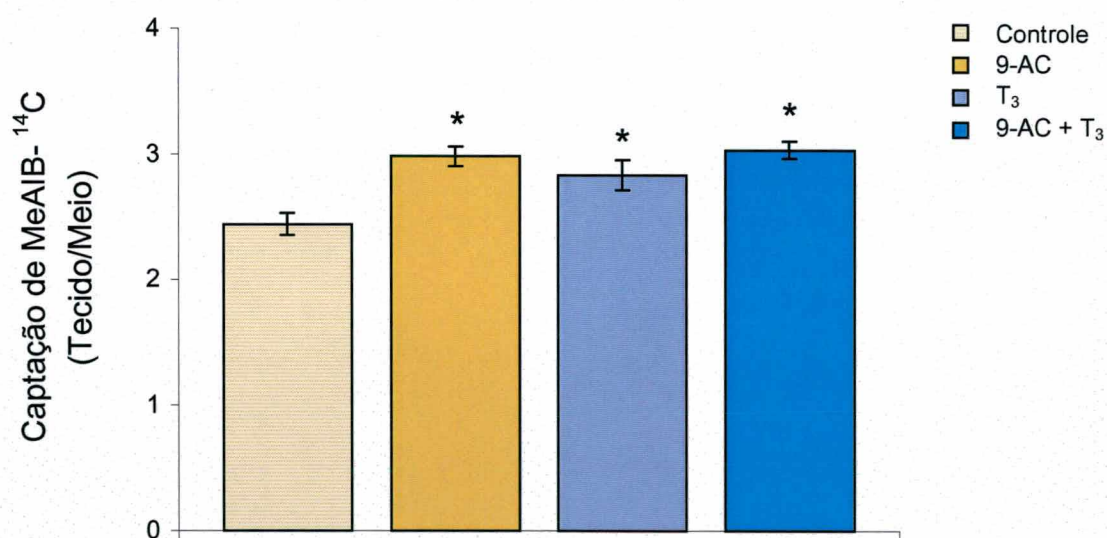
### 3.6.2. Efeito do Ácido Carboxílico 9-Antraceno (100 $\mu$ M) na Ação Estimulatória do $T_3$ no Transporte de Aminoácido

O bloqueador de canais de cloreto 9-AC (100  $\mu$ M) não impediu o efeito estimulatório do  $T_3$  no transporte do aminoácido MeAIB- $^{14}$ C em testículos de ratos imaturos.

**Tabela 3.11:** Efeito do bloqueador de canais de cloreto 9-AC (100  $\mu$ M) na ação estimulatória do  $T_3$  na captação de MeAIB- $^{14}$ C.

Concentração	Captação de MeAIB- $^{14}$ C (T/M)
0 M (Controle)	2,44 $\pm$ 0,09
9-AC 100 $\mu$ M	2,98 $\pm$ 0,07*
$T_3$ 10 $^{-7}$ M	2,83 $\pm$ 0,12*
9-AC + $T_3$	3,03 $\pm$ 0,07*

(Valores da Figura 3.11) (Média  $\pm$  EPM); \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle.



**Figura 3.11:** Efeito do ácido carboxílico 9-antraceno (100  $\mu$ M) no efeito estimulatório do  $T_3$  no transporte de MeAIB- $^{14}$ C em testículos de ratos imaturos. Pré-incubação: 30 min, Incubação: 60 min. Controle (n= 9); 9-AC 100  $\mu$ M (n= 7);  $T_3$  (n= 7);  $T_3$  + 9-AC (n= 4); \* $p \leq 0,05$  em relação ao grupo controle.

## 4. DISCUSSÃO

A ação do hormônio  $T_3$  a nível nuclear, envolvendo modulação da expressão de genes e síntese protéica, é clássica e, portanto, bem estabelecida. Entretanto, outras vias de transdução de sinais caracterizadas por rápidas respostas também podem ser reguladas por este hormônio e, por isso, têm recebido grande atenção. Inúmeras evidências indicam que o hormônio tireoideo afeta diretamente diversas funções metabólicas através de ação em sítios na membrana plasmática. Estes efeitos são independentes da síntese protéica e estão relacionados com mudanças do fluxo celular de íons e substratos (Segal, 1989; Silva et al., 2002).

Em células de Sertoli o hormônio  $T_3$  apresenta ações rápidas na membrana plasmática, estimulando o transporte do aminoácido neutro MeAIB- $^{14}C$  e promovendo alterações no potencial de membrana destas células. O efeito estimulatório do  $T_3$  na captação de aminoácido é dependente da idade, mostrando-se efetivo em testículos de ratos pré-púberes com idade entre 6 e 13 dias (Silva et al., 2001). Esta evidência coincide com a expressão, dependente da idade, de receptores funcionais de  $T_3$  em células de Sertoli de testículos pré-púberes (Palmero et al., 1995). Estudos eletrofisiológicos demonstraram que o  $T_3$  produz uma hiperpolarização imediata e transitória em células de Sertoli. No entanto, a relação entre estes eventos de membrana, transporte de aminoácidos e hiperpolarização, regulados por  $T_3$ , não é clara e requer investigações adicionais.

Apoiados nestas evidências, Silva e colaboradores (2001) propõem que o efeito do  $T_3$  em sítios da membrana plasmática poderia sinalizar vias que levam à ativação de canais de  $K^+$  e/ou  $Cl^-$ , modulados por cálcio, estimulando o co-transporte de  $Na^+$ -aminoácido. A partir desta proposta, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar alguns mecanismos que envolvem a ação do  $T_3$  na regulação do transporte do aminoácido modelo MeAIB- $^{14}C$  em testículos de ratos imaturos.

Segundo Silva e colaboradores (2001), o hormônio  $T_3$  estimula a captação *in vitro* de aminoácidos em células de Sertoli em doses de  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$  M. Concentrações inferiores a estas não foram estudadas no transporte de MeAIB- $^{14}C$  por estes autores.

De acordo com a Figura 3.1, nossos resultados demonstram que concentrações inferiores ( $10^{-8}$  M) deste hormônio não apresentam ação estimulatória neste evento rápido de membrana. Semelhantemente, estudos anteriores realizados em outros tecidos, demonstraram que o  $T_3$ , em concentrações de  $10^{-7}$  M -  $10^{-5}$  M produz um rápido aumento no acúmulo de diversos aminoácidos neutros (Segal, 1989). De acordo com estas evidências foi escolhida a dose  $10^{-7}$  M do hormônio  $T_3$  para a continuação deste trabalho.

O aminoácido modelo não metabolizável MeAIB- $^{14}C$  é captado através do sistema “A” de transporte que é caracterizado por ser dependente de  $Na^+$  e energia, e sensível a alterações do potencial de membrana, basicamente por depender de um equilíbrio iônico (Lerner, 1985; Bussolati et al., 1986). A regulação hormonal deste sistema de transporte é descrita para diversos hormônios como FSH, retinol, isoproterenol (Cruz-Curte & Wassermann, 1985; Wassermann et al., 1993; Wassermann et al., 1996) e para  $T_3$  (Silva et al., 2001). Estes hormônios atuam ativando sinais na membrana que culminam na modulação do transporte.

Para verificar a possível regulação, por um sistema dependente de cálcio, no transporte de aminoácidos estimulado por  $T_3$ , utilizou-se neste estudo agentes que interferem na homeostasia deste íon. A importância do cálcio extracelular e do influxo deste íon através de canais dependentes da voltagem, presentes na membrana plasmática, foi avaliada pelo uso de quelantes de cálcio extracelular e de agentes que inibem os movimentos de  $Ca^{++}$  através de canais na membrana plasmática.

A avaliação do envolvimento de cálcio extracelular no transporte de aminoácidos basal e estimulado por  $T_3$  foi realizada pela adição de EGTA, um eficiente quelante de  $Ca^{++}$  extracelular. A captação basal do aminoácido MeAIB- $^{14}C$  foi diminuída na presença de EGTA, sendo que não houve diferença significativa entre as doses utilizadas. Na presença de  $T_3$ , demonstrou-se que o EGTA anula completamente o efeito estimulatório deste hormônio sobre o acúmulo de MeAIB- $^{14}C$  em células de Sertoli. Este resultado evidencia a dependência de cálcio extracelular e o envolvimento de vias dependentes deste íon no sistema “A” de transporte. Outros autores também demonstraram a importância do cálcio extracelular no transporte de aminoácidos neutros em fatias de córtex renal (Goldstone et al., 1983).

O cálcio é um importante sinalizador intracelular, mediando respostas a estímulos promovidos por hormônios ou neurotransmissores. A transdução de sinais mediada pelo cálcio requer, na maioria das vezes, um aumento da concentração citoplasmática deste íon.

Este aumento pode ocorrer através do influxo de cálcio extracelular através da membrana plasmática, via abertura de canais ou através da liberação de cálcio de reservatórios intracelulares, como o retículo endoplasmático (Clapham,1995).

Os canais de cálcio dependentes da voltagem (CCDV) constituem uma das principais vias de entrada deste íon na célula. A avaliação do envolvimento de CCDV no transporte basal e estimulado por  $T_3$  foi realizada com o uso de verapamil, um bloqueador específico destes canais. O verapamil promoveu uma redução significativa do transporte basal de aminoácidos em células de Sertoli. Da mesma forma, Wassermann e Loss (1989) demonstraram que a captação basal de MeAIB- $^{14}C$  nestas células foi diminuída pelo acréscimo de verapamil.

Quando avaliada a influência de canais de cálcio dependentes da voltagem no acúmulo de MeAIB- $^{14}C$  estimulado por  $T_3$ , observou-se que o bloqueio específico destes canais anulou completamente o efeito estimulatório do  $T_3$ . Estes resultados esclarecem que a entrada de cálcio extracelular, neste evento, se dá principalmente através destas classes de canais, comprovando a total dependência destas vias. Esta ação estimulatória no transporte de MeAIB- $^{14}C$ , dependente de cálcio extracelular e de canais de cálcio dependentes da voltagem foi, também descrita para hormônios como FSH e retinol (Wassermann, et al., 1989; Wassermann, et al., 1992a; Wassermann, et al., 1993). Estes resultados indicam que o influxo de cálcio extracelular através de canais de cálcio dependentes da voltagem, parece ser um sinal regulatório para o transporte de aminoácidos estimulados por estes hormônios, inclusive para o hormônio  $T_3$ .

Desde que nossos resultados apontam para o envolvimento de vias dependentes de cálcio no transporte de aminoácidos, estimulado por  $T_3$ , estudamos, também o papel do cálcio proveniente de estoques intracelulares neste evento. Para melhor avaliação deste envolvimento utilizamos o fármaco BAPTA-AM que atua depletando o cálcio intracelular.

Nestes experimentos, primeiramente foram estudadas diversas concentrações do fármaco na captação basal de MeAIB- $^{14}C$ . Os resultados demonstraram que nenhuma das concentrações utilizadas promoveu alterações significativas no transporte basal. Posteriormente, avaliou-se o envolvimento do cálcio intracelular, na ação estimulatória do  $T_3$  no acúmulo de aminoácidos em células de Sertoli. O BAPTA não se mostrou efetivo em diminuir ou bloquear os efeitos estimulatórios deste hormônio no transporte de MeAIB- $^{14}C$ .

Estes resultados, em adição aos resultados obtidos com o EGTA e verapamil reforçam o entendimento de que o cálcio extracelular é imprescindível para a ação rápida do T<sub>3</sub> no transporte de aminoácidos. Estas evidências apontam para o envolvimento de vias dependentes de cálcio extracelular e independentes dos estoques intracelulares deste íon no transporte de MeAIB-<sup>14</sup>C estimulado por T<sub>3</sub>.

O cálcio externo parece ser um mediador intracelular comum para algumas das ações imediatas promovidas por T<sub>3</sub> e por alguns hormônios esteróides. Como os mecanismos que envolvem ações genômicas são geralmente lentos, ter o cálcio como um mediador celular em alguns eventos, possibilitaria uma via de ação mais rápida para estes hormônios. Porém, ainda pouco é conhecido sobre os mecanismos que envolvem a relação deste íon com o transporte de aminoácidos e respostas celulares rápidas.

Edmondson & Lumeng (1980) sugerem que a regulação hormonal não-genômica do sistema "A" de transporte de aminoácidos envolva uma hiperpolarização na membrana plasmática ou outras alterações no potencial de membrana. Associado a isto, a descoberta de que o hormônio T<sub>3</sub> promove uma hiperpolarização em células de Sertoli de ratos imaturos levantou a hipótese deste evento estar relacionado ao estímulo da captação de MeAIB-<sup>14</sup>C.

A hiperpolarização da célula se caracteriza pelo surgimento de um potencial elétrico mais negativo, gerado por alterações no fluxo iônico da célula através da abertura e/ou fechamento de canais iônicos. A geração de um potencial mais negativo (hiperpolarização), freqüentemente está associado a abertura de canais de K<sup>+</sup> e/ou fechamento de canais de Cl<sup>-</sup> (Sartor et al., 1990). Estes eventos podem ser ativados através da ação direta do hormônio a canais iônicos, ou então, serem modulados por mensageiros intracelulares. Como demonstrado para alguns hormônios, alterações no potencial elétrico da célula podem influenciar eventos de membrana.

Alterações eletrofisiológicas na membrana de células de Sertoli foram promovidas por diversas substâncias como FSH, isoproterenol, retinol e T<sub>3</sub>. Estas alterações provavelmente estão relacionadas com a ativação de fenômenos de membrana, como a captação de aminoácidos (Wassermann, et al., 1990; Wassermann, et al., 1992b; Loss, et al., 1998; Silva, et al., 2001). Porém, cada hormônio apresenta efeito específico e peculiar sobre a membrana plasmática.

Leite e colaboradores (1999), demonstraram que a testosterona induz uma imediata despolarização na membrana e estimula a captação de  $^{45}\text{Ca}^{+2}$  em células de Sertoli. Estes eventos apontam para uma ação rápida e de alta especificidade na membrana destas células, sugerindo ação não-genômica, provavelmente envolvendo canais de cálcio dependentes da voltagem e fechamento de canais de  $\text{K}^+$  sensíveis ao ATP (Miranda, 1999).

Em lactotrófos hipofisários, Sartor e colaboradores (1990) observaram que o TRH ( $10^{-7}$  M) induz uma transitória hiperpolarização. Este efeito foi associado a concomitante ativação da condutância de  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  via liberação de cálcio intracelular.

Em células de Sertoli, o  $\text{T}_3$  produz uma hiperpolarização imediata, evento que demonstra, assim como a captação de aminoácidos, uma ação rápida deste hormônio na membrana destas células. Para investigar o envolvimento de canais de  $\text{K}^+$  e de  $\text{Cl}^-$  na captação de aminoácidos estimulada por  $\text{T}_3$  em testículos de ratos imaturos, estudamos o efeito de bloqueadores de canais de  $\text{K}^+$  e de  $\text{Cl}^-$  neste transporte.

Para estudarmos o envolvimento de canais de  $\text{K}^+$  sensíveis ao ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) no transporte do aminoácido neutro estimulado por  $\text{T}_3$ , utilizamos a tolbutamida, um bloqueador específico destes canais. Em relação ao transporte basal, a tolbutamida produziu uma redução de aproximadamente 13% na captação e este efeito não foi dependente da dose, sendo que uma redução mais acentuada somente foi evidenciada em concentrações muito mais elevadas. Semelhantemente, Miranda (1999) demonstrou que o uso de um agonista de canais de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  estimulou o transporte basal de aminoácidos em células de Sertoli.

No estudo do efeito deste bloqueador de  $\text{K}_{\text{ATP}}$  na presença de  $\text{T}_3$ , nossos resultados mostraram que a tolbutamida anulou completamente a ação estimulatória do  $\text{T}_3$  no transporte de aminoácidos em células de Sertoli. Estes resultados demonstram que a atividade destes canais é imprescindível para a ação estimulatória do  $\text{T}_3$  no transporte de  $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$  em testículos de ratos imaturos.

Neste mesmo tipo celular, Joffre e Roche (1988) observaram que o FSH promove uma hiperpolarização na membrana plasmática de células de Sertoli de ratos imaturos e este efeito foi relacionado à ativação de canais de  $\text{K}^+$  sensíveis ao ATP. Além disto, o efeito hiperpolarizante foi modificado por alterações no cálcio intra e extracelular (Joffre & Roche, 1988; Roche & Joffre, 1989).



A atividade de canais de  $\text{Cl}^-$  pode ser modulada por diversos fatores que incluem a voltagem da membrana e o íon cálcio. Canais de  $\text{Cl}^-$  ativados por  $\text{Ca}^{++}$  foram caracterizados em células de Sertoli e estudos posteriores demonstraram que estes canais são ativados pelo cálcio intracelular (Lalevée & Joffre, 1999). No entanto, alguns canais de cloreto podem, também, ser dependentes do cálcio extracelular. Valverde e colaboradores (2002) descreveram que a modulação de canais de cloreto dependentes da voltagem constitui um exemplo de efeitos rápidos promovidos por estrógenos.

O ácido carboxílico 9-antraceno é um importante fármaco bloqueador de canais de  $\text{Cl}^-$ . Segundo Jentsch e colaboradores (2002) diversas drogas apresentam ação inibitória sobre diversos tipos de canais de  $\text{Cl}^-$ . Desta forma torna-se difícil uma seletividade específica sobre determinada classe de canal e, assim, estabelecer qual tipo de canal de  $\text{Cl}^-$  está sendo efetivamente bloqueado pelo fármaco. Além disto, os autores descrevem que um mesmo bloqueador pode antagonizar canais diferentes dependendo das concentrações utilizadas.

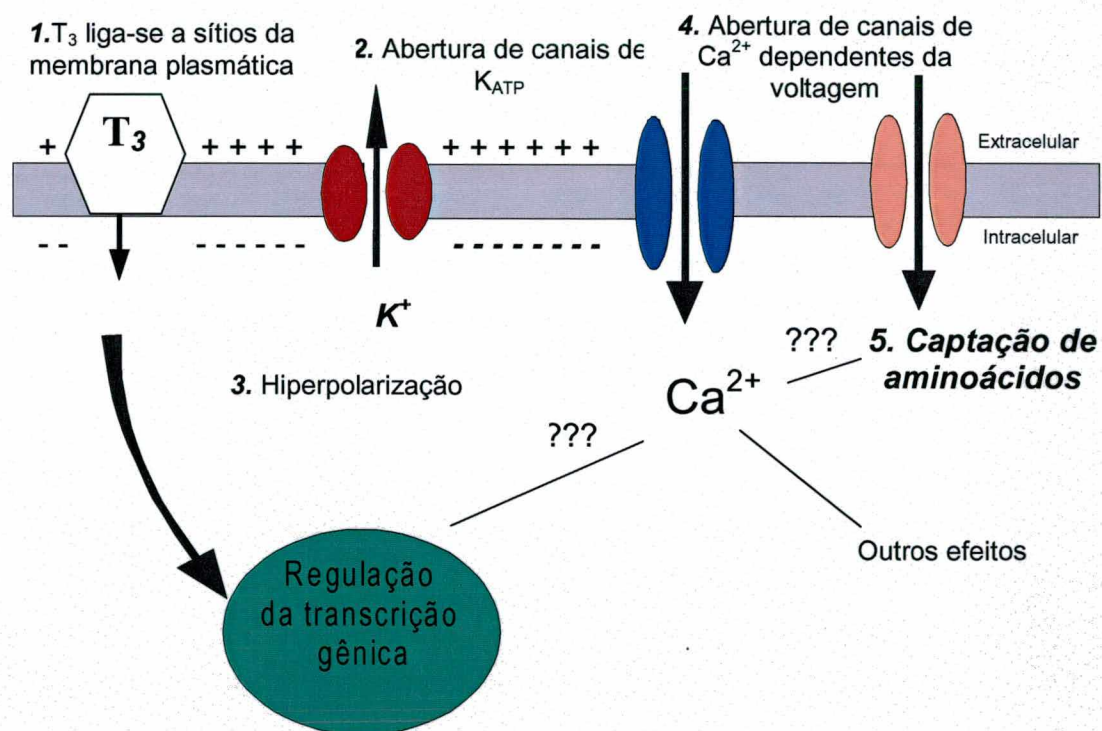
Utilizando o bloqueador de canais de  $\text{Cl}^-$ , 9-AC, observamos que a concentração de 100  $\mu\text{M}$  deste fármaco não foi efetiva em bloquear o efeito estimulatório do  $\text{T}_3$  no transporte de  $\text{MeAIB-}^{14}\text{C}$  em células de Sertoli.

Em contra partida, o 9-AC mostrou estimular o transporte basal deste aminoácido em concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$ . Uma explicação mais efetiva para este evento requer investigações adicionais, porém sugere-se que o bloqueio destes canais poderia induzir uma despolarização na membrana destas células, levando a abertura de CCDV e conseqüentemente, a entrada de cálcio na célula. Como demonstrado por outros autores citados anteriormente, assim como por este trabalho, o influxo de cálcio através de CCDV parece ser um importante evento que precede a captação basal de aminoácidos (Wassermann, et al., 1990; Wassermann, et al., 1992a; Silva et al., 2002).

Estes resultados, juntamente com os resultados obtidos com o bloqueio de canais de  $\text{K}^+$ , sugerem que a hiperpolarização promovida pelo  $\text{T}_3$  em células de Sertoli poderia ser mediada pela abertura de canais de  $\text{K}^+$  presentes na membrana destas células. Esta abertura promoveria a saída de  $\text{K}^+$  da célula tornando-a mais negativa (hiperpolarizada).

A regulação hormonal não-genômica do transporte de aminoácidos está freqüentemente associada a alterações do potencial de membrana da célula e do fluxo iônico na membrana.

Segundo a revisão de Lerner (1985), o gradiente iônico é um fator importante no movimento energizado de aminoácidos através da membrana plasmática. Desta forma, diversos íons podem funcionar como co-substratos e estimular a captação de aminoácidos. Alterações rápidas no fluxo iônico podem ser promovidas pela regulação direta ou indireta da atividade de canais iônicos presentes na membrana (Silva et al., 2002). Estas evidências, juntamente com os resultados demonstrados por outros hormônios sugerem que a hiperpolarização promovida pelo  $T_3$  nas células de Sertoli possa estar envolvida no efeito estimulatório deste hormônio na captação de MeAIB- $^{14}C$ . Acredita-se que o  $T_3$  modularia direta ou indiretamente canais de  $K_{ATP}$  presentes na membrana plasmática destas células. Esta modulação induziria a hiperpolarização (através da abertura de canais de  $K_{ATP}$ ), que por sua vez, ativaria canais de cálcio dependentes da voltagem. Estes canais já foram caracterizados em células de Sertoli por Lalevée e Joffre (1999). O influxo de cálcio extracelular por estes canais modularia, então, por vias não elucidadas, o co-transporte de  $Na^+$ -aminoácido.



**Figura 4.1:** Esquema da hipótese do mecanismo de ação do hormônio  $T_3$  sobre a captação de aminoácidos neutros em testículos de ratos imaturos.

Porém estudos adicionais futuros, incluindo estudos eletrofisiológicos utilizando estes bloqueadores de canais, poderão auxiliar na elucidação do mecanismo pelo qual o hormônio T<sub>3</sub> induz esta hiperpolarização, e assim, poder-se-á avaliar e melhor entender a possível relação deste evento com a captação de aminoácidos.

Acredita-se que a sinalização não-genômica envolvendo rápidas respostas funcionaria como um evento preparatório para a modulação gênica. A integração de múltiplos sistemas de sinalização hormonal surge como um novo conceito de transdução de sinais, indicando uma grande variedade e complexidade dos mecanismos de ações hormonais (Silva et al., 2002). Apesar dos extensivos trabalhos envolvendo ações rápidas de esteróides em diversos tecidos e sistemas, os mecanismos que envolvem estas ações ainda são alvos de inúmeras pesquisas e questionamentos. A elucidação dos mecanismos que envolvem esta complexidade de ações hormonais refletiria em inúmeras implicações clínicas, como a descoberta de novos sítios de intervenção terapêutica e o desenvolvimento de agonistas e antagonistas mais efetivos e específicos para estes hormônios.

## 5. CONCLUSÕES

Dos dados obtidos neste trabalho chegou-se às seguintes conclusões:

- 1) A ação estimulatória do hormônio  $T_3$  no transporte do aminoácido neutro MeAIB- $^{14}C$  em testículos de ratos imaturos foi diminuída na presença de EGTA, indicando que esta ação do  $T_3$  é dependente de  $Ca^{++}$  extracelular.
- 2) Na presença de verapamil, a ação estimulatória do  $T_3$  no transporte de MeAIB- $^{14}C$  foi significativamente afetada. Este resultado indica o envolvimento de canais de  $Ca^{++}$  dependentes da voltagem do tipo "L" neste efeito promovido pelo hormônio.
- 3) O  $Ca^{++}$  citosólico e proveniente dos estoques intracelulares parece não estar diretamente envolvido na captação de MeAIB- $^{14}C$  estimulado por  $T_3$ , visto que na presença de BAPTA, um quelante de  $[Ca^{++}]_i$ , não houve alteração do efeito estimulatório do  $T_3$  no transporte.
- 4) A ação estimulatória do  $T_3$  na captação de MeAIB- $^{14}C$  foi bloqueada na presença de tolbutamida sugerindo o envolvimento de canais de  $K^+$  dependentes de ATP neste fenômeno.
- 5) O bloqueio de canais de cloreto ( $Cl^-$ ) não produziu alterações significativas no efeito estimulatório do  $T_3$  no transporte de aminoácidos, indicando que estas classes de canais provavelmente não estejam envolvidas no mecanismo de ação do  $T_3$  na captação de aminoácidos.

Assim, conclui-se de maneira geral, que o envolvimento de canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP e de vias dependentes de cálcio são imprescindíveis para o efeito estimulatório do hormônio  $T_3$  no transporte de aminoácidos neutros em testículos de ratos imaturos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMSON, L.F.; INGBAR, S.H. Selective alteration by triiodothyronine of amino acid transport in embryonic chick bone. *Endocrinology*, v.81, p.1362-1371, 1967.

AIRES, M.M. *Fisiologia*. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 1999.

ASHCROFT, S.J.H.; ASHCROFT, F.M. Properties and functions os ATP-sensitive K-channels. *Cellular Signalling*, v.2, n.3, p.197-214, 1990.

BARANN, M.; GÖTHERT, M.; BRÜSS, M.; BÖNISCH, H. Inhibition by steroids of [<sup>14</sup>C]-guanidinium flux through the voltage-gated sodium channel and the cation channel of the 5-HT<sub>3</sub> receptor of NIE-115 neuroblastoma cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives Pharmacology*, v.360, p.234-24, 1999.

BASS, R.; HEDERGAARD, H.B.; DILLRHAY, L.; MOFFET, J.; ENGLESBERG, E. The A, ASC and L systems for the transport of amino acid in Chinese hamster ovary cells. *The Journal Biological Chemistry*, Baltimore, v.256, p.10259-10266, 1981.

BOLAND, A.; NORMAN, A. Influx of Extracellular Calcium Mediates 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-Dependent Transcaltachia (the Rapid Stimulation of Duodenal Ca<sup>2+</sup> Transport). *Endocrinology*, v.127, p.2475-2480, 1990.

BEETON, C.; BARBARIA, J.; GIRAUD, P.; DEVAUX, J.; BENOLIEL, A.M.; GOLA, M.; SEBATIER, J.M., BERNARD, D.; CREST, M.; BERAUD, E. Selective blocking of voltage-gated K<sup>+</sup> channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation. *Journal of Immunology*, v.166, p.936-944, 2001.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N. *Princípios da Fisiologia*. 1.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1991. v.40, p.476-497.

BERNARD E.A.; WASSERMANN, G.F. Testicular glycoprotein biosynthesis stimulated by in vivo administration of follicle stimulating hormone. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.44, p.45-47, 1982.

BIKHAZI, A.B.; ABU SALBI, M.N.; ITANI, J.H. Transcellular mechanism of amino acid uptake by distal rat ileum "in situ". *Comparative Biochemical and Physiological*, v.80A, p.5-9, 1985.

BOYD III, A.E. Sulfonylerea receptors, ion channels, and fruit fillies. *Diabetes*, v.37, p.847-850, 1988.

BRONSTON, C.; BRONSTON, M.A. Calcium-dependent regulation of protein syntesi in intact mammalian cells. *Annual Review of Physiology*, v.52, p.577-590, 1980.

- BUSSOLATI, O.; LARIS, P.C.; LONGO, N.; DALL'ASTA, V.; FRANCHI-GAZZOLA, R.; GUIDOTTI, G.G. Effect of extracellular potassium on amino acid transport and membrane potential in fetal human fibroblasts. *Biochemica et Biophysica Acta*, v.854, p.240-250, 1986.
- CHEN, C.; HESS, P. Mechanism of gating of T-type calcium channels. *Journal of General Physiology*, v.96, p.603-630, 1990.
- CHEN, H.C.; FARESE Jr., R.V. Interactions with membrane-bound receptors. *Current Biology*, v.9, p.478-481, 1999.
- CHRISTENSEN, H.N. Mode of transport of amino acid into cells. In: MC ELRDY, W.D.; GLASS, M.B. *Symposium of Amino Acid Metabolism*, p.63, 1955.
- CLAPHAM, D.E. Calcium Signaling. *Cell*, v.80, p.259-268, 1995.
- COBBET, P.; INGRAM, D.C.; MASON, W.T. Voltage-activated currents through calcium channels in normal bovine lactotrophs. *Neuroscience*, v.23, p.661-677, 1987.
- COOKE, P.; MEISAMI, E. Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. *Endocrinology*, v.129, p.237-243, 1991.
- COUROT, M.; KILGOUR, R.J. Endocrine control of mammalian testicular ontogenesis. *Archivos de Biologia y Medicina Experimentales*, v.17, p.249-255, 1984.
- CRUZ CURTE, A.; WASSERMANN, G.F. Identification of amino acid transport systems stimulated by FSH in rat testes. *Journal of Endocrinology*, v.106, p.291-294, 1985.
- D'AGOSTINO, A.; MENE, R.; STEFANINI, M. Voltage-gated calcium channels in rat Sertoli cells. *Biology of Reproduction*, v.46, p.414-418, 1992.
- DAVIDSON, J.B.; WAKEFIELD, I.K.; KING, J.A.; MULLIGANN, G.P.; MILLAR, R.P. Dual pathways of calcium entry in spike and plateau phases of luteinizing hormone release from chicken pituitary cells: sequential activation of receptor operated and voltage-sensitive calcium channels by gonadotropin-releasing hormone. *Molecular Endocrinology*, v.2, p.382, 1988.
- DAVILA, H.M. Molecular and functional diversity of voltage-gated calcium channels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.868, p.102-117, 1999.
- EDMONDSON, J.W.; LUMEN, G.L. Biphasic stimulation of amino acid uptake by glucagons in hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, v.96, p.61-68, 1980.
- EDWARD, G.; WESTON, A.H. The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v.33, p.597-637, 1993.

- FALKENSTEIN, E.; TILLMANN, H.C.; CHRIST, M.; FEURING, M.; WEHLING, M. Multiple actions of steroid hormones-A focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacological Reviews*, v.52, p.513-555, 2000a.
- FALKENSTEIN, E.; NORMAN, A.W.; WELLING, M. Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action (s). *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.85, p.2072-2075, 2000b.
- FAWCETT, D.W. *Sistema Reprodutor Masculino*. In: Tratado de Histologia. 12. ed. México: Interamericana-McGraw-Hill, Ed. Ferrero, M.Madri, 1995, p.833-883.
- FELIG, P.; BASTTOR, J.D.; FROHMAN, L.A. *Endocrinology and Metabolism*. New York: McGraw-Hill, Inc. Health Professions Divisions, 1995.
- FRANCINI, F.; PIROTTE, B.; GAGLIARDINO, J.J. Effect of activators and inhibitors of K<sup>+</sup> channels on insulin secretion in the amphibian pancreas. *Archives of Physiology and Biochemistry*, v.105, n.1, p.66-70, 1997.
- GARCIA, L.; FAHMI, M.; PREVARSKAYA, N.; DUFY, B.; SARTOR, P. Modulation of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> conductance by changing Cl<sup>-</sup> concentration in rat lactotrophs. *The American Journal of Physiology*, v.85, p.272:C1178, 1997.
- GARDOS, G. The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochimic and Biophysic Acta*, v.39, p.652-654, 1958.
- GECK, P.; HEINZ, E. Coupling in secondary transport: effect of electrical potentials on the kinetics of ion linked co-transport. *Biochemica et Biophysica Acta*, v.443, p.49-53, 1976.
- GOLDFINE, I.D.; SIMONS, C.G.; INGBAR, S.H. Stimulation of the uptake of L-aminoisobutyric acid in rat thymocytes by L-triiodothyronine: a comparison with insulin and dibutyryl cyclic AMP. *Endocrinology*, v.96, p.802-809, 1975.
- GOLDSTONE, A.D.; KOENIG, H.; LU, C.Y. Androgenic stimulation of endocytosis, amino acid and hexoses transport in mouse kidney cortex involves increased calcium fluxes. *Biochemnical et Biophysica Acta*, v.371, p.762-766, 1983.
- GUIDOTTI, G.G.; BORGHETTI, A.F.; GAZZOLA, G.C. The regulation of amino acid transport in animal cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.515, p.329-366, 1978.
- GUIDOTTI, G.G.; GAZZOLA, G.C.; FRANCHI-GAZZOLA, R. Regulation of membrana transport in Eukariotes. *Advances in Cytopharmacology*, v.2, p.155-162, 1974.
- GRASSO, P.; REICHERT, L.E. Jr. Follicle-stimulating hormone receptor-mediated uptake of <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> by proteoliposomes and cultured rat Sertoli cells: evidence for involvement of voltage-activated and voltage-independent calcium channels. *Endocrinology*, v.125, p.3029-3036, 1989.

- HAN, X.; LIGHT, P.E.; GILES, W.R.; FRENCH, R.J. Identification and properties of an ATP-sensitive K<sup>+</sup> current in rabbit sino-atrial node pacemaker cells. *Journal of Physiology*, v.490, n.2, p.337-350, 1996.
- HOCKERMAN, G.H.; PETERSON, B.Z.; JOHNSON, B.D.; CATTERALL, W.A. Molecular determinants of drug binding and action on L-type calcium channels. *Annual Review of Pharmacological and Toxicology*, v.37, p.361-396, 1997.
- HOSEY, M.M.; LAZDUNSKI, M. Calcium channels: molecular pharmacology, structure and regulation. *Journal of Membrane Biology*, v.104, p.81-105, 1988.
- IRUSTA, O.; WASSERMANN, G.F. FSH action on the  $\alpha$ -aminoisobutyric acid transport in the pre-puberal rat testes. *Acta Physiologica Latinoamericana*, v.22, p.276-278, 1972.
- JENTSCH, T.J.; STEIN, V.; WEINREICH, F.; ZDEIBIK, A.A. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiological Reviews*, v.82, p.503-568, 2002.
- JOFFRE, M.; ROCHE, A. Follicle-stimulating hormone induces hyperpolarization of immature rat Sertoli cells in monolayer culture. *Journal of Physiology*, v.400, p.481-499, 1988.
- ROCHE, A.; JOFFRE, M. Effect of uncoupling treatments on FSH-induced hyperpolarization of immature rat Sertoli cell from Sertoli cell-enriched cultures. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.85, p.343-354, 1989.
- KHANNA, N.C.; TOKUDA, M.; WAISMAN, D.M. The role of calcium binding protein in signal transduction. In: COOKE, B.A.; KING, R.J B.; VAN DER MOLEN, H.J. *Hormone and their actions*. Parte II, p.63, 1988.
- KILBERG, M.S.; CHRISTENSEN, H.N.; HANDLOGTEN, M.E. Cysteine as a system-specific substrate for transport system ASC in rat hepatocytes. *Biochemical and Physiological Research Communication*, v.88, p.744-751, 1979.
- KOESTER, J.; SIEGELBAUM, S. Ion channels. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. *Essentials of neural science and behavior*. Editora Prentice Hall International, Inc. p.115-132, 1995.
- LALÉVÉE, N.; PLUCIENNIK, F.; JOFFRE, M. Voltage-dependent calcium current with properties of T-type current in Sertoli cells from immature rat testis in primary cultures. *Biology of Reproduction*, v.56, p.680-687, 1997.
- LALÉVÉE, N.; JOFFRE, M. Inhibition by cAMP of calcium-activated chloride currents in cultured Sertoli cells from immature testis. *Journal of Membrane Biology*, v.169, p.167-174, 1999.
- LE CAM, A.E.; FREYCHET, P. Neutral amino acid transport. *The Journal of Biological Chemistry*, v.252, p.148-156, 1977.



LEITE, L.; LUCHI, R.; VON LEDEBUR, E.I.C.F.; LOSS, E.S.; WASSERMANN, G.F. Testosterone induces immediate membrane depolarization and stimulates  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake in Sertoli cells from rats of different maturation stages. *Medical Science Research*, v.27, p.25-58, 1999.

LERNER, J. Effectors of amino acid transport processes in animal cell membranes. *Comparativa Biochemistry Physiology*, v.81(A), p.713-739, 1985.

LODISH, H.; BALTIMORE, D.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; DARNELL, J. Molecular cell biology. 5. ed. Nova York: Editora Scientific American Books, Inc, 1998.

LONG, C. Chemical Data. In: VAN NOSTRAND, D. *Biochemist's handbook*. New Jersey, p.85, 1961.

LOSS, E.S.; BARRETO, K.P.; LEITE, L.; WASSERMANN, G.F. Comparative study of the actions of isoproterenol and retinol on amino acid accumulation,  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  uptake and membrane potential in Sertoli cells. *Medical Science Research*, v.26, p.195-199, 1998.

LOECHNER, K.J.; KNOX, R.J.; MC LAUGHLIN, J.T.; DUNLAP, K. Dexamethasone-mediated inhibition of calcium transients and ACTH release in a pituitary cell line (AtT-20). *Steroids*, v.64, p.404-412, 1999.

LYNG, F.M.; JONES, G.R.; ROMMERTS, F.F. Rapid androgen actions on calcium signaling in rat Sertoli cells and two human prostatic cell lines: similar biphasic responses between 1 picomolar and 100 nanomolar concentrations. *Biology of Reproduction*, v.63, p.736-747, 2000.

MARTY, A.; TAN, Y.P.; TRAUTMAN, A. Three types of calcium dependent channel in rat lacrimal gland. *Journal Physiology of London*, v.357, p.293-325, 1984.

McGIVAN, J.D.; PASTOR-ANGLADA, M. Regulatory and molecular aspects of mammalian amino acid transport. *Biochemical Journal*, v.299, p.321-334, 1994.

McGIVAN, J.D. Mammalian o acid transporters and their regulation. *Biochemical Society Transactions*, v.24, p.837-838, 1996.

MIRANDA, M.J. Glibenclamida estimula a captação de  $^{45}\text{Ca}^{++}$  e o transporte de MeAIB- $^{14}\text{C}$  em células de Sertoli de testículos de ratos imaturos. 1999.143f. *Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

NOMA, A. ATP-regulated  $\text{K}^+$  channels in cardiac muscle. *Nature*, v.305, p 147-148, 1983.

NORMAN, P.S.R.; MANN, G.E. Secretagoques induced changes in system A amino acid transport in the rat exocrine pancreas: atimulation of 2-methylaminoisobutyric acid efflux by carbachol. *Biochemia et Biophysica Acta*, v.943, p.541-546, 1988.

NORMAN, A.W.; LITWACK, G. Thyroid Hormones. In: *Hormones*. 2. ed. San Diego: Editora Academic Press, 1997.

- PALMERO, S.; De MARCO, P.; FUGASSA, E. Thyroid Hormone receptor mRNA expression in Sertoli cells isolated from prepuberal testis. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 14, p. 131-134, 1995.
- PETERSEN, O.H.; PETERSEN, C.C.H.; KASAI, H. Calcium and hormone action. *Annual Review of Physiology*, v.56, p.297-319, 1994.
- PEREZ-SANCHES, V.H.; WASSERMANN, G.F. Amino acid transport in rat Sertoli cell enriched testes: studies on the mechanism of action of follicle-stimulating hormone. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.14, p.11-17, 1981.
- RABE, A.; FROMTER, E. Micromolar concentrations of steroids and of aldosterone antagonists inhibit the outwardly rectifying chloride channel with different kinetics. *Pflugers Archives*, v.439, p.559-566, 2000.
- ROCHE, A.; JOFFRE, M. Effect of uncoupling treatments on FSH-induced hyperpolarization of immature rat Sertoli cells from Sertoli cell-enriched cultures. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.85, p.343-354, 1989.
- ROSS, M.H.; ROMRELL, L.J. Sistema genital masculino. In: *Histologia: Texto e Atlas*. 2. ed. São Paulo: Editora Panamericanas, 1993.
- RUEHLMANN, D.O.; STEINERT, J.R.; VALVERDE, M.A.; JACOB, R.; MANN, G.E. Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type  $Ca^{2+}$  channels in smooth muscle cells. *FASEB Journal*, v.12, p.613-619, 1998.
- SAH, P.; LOUISE FABER, E.S. Channels underlying neuronal calcium activated potassium currents. *Progress in Neurobiology*, v.66, p.343-353, 2002.
- SARTOR, P.; DUFY-BARBE, L.; CORCUFF, J.B.; TAUPIGNON, A.; DUFY, B. Electrophysiological response to the thyrotropin-releasing hormone of rat lactotrophs in primary culture. *The American Journal of Physiology*, v.258, p.311-319, 1990.
- SEGAL, J. Action of the thyroid hormone at the level of the plasma membrane. *Endocrine Research*, v.15(4), p.619-649, 1989.
- SEGAL, J.; GORDON, A. The effects of actinomycin D, puromycin, cycloheximide and hydroxyurea on 3',5,3-Triiodo-L-thyronine stimulated 2-deoxy-D-glucose uptake in chick embryo. *Endocrinology*, v.101, p.150-156, 1975.
- SEGAL, J. In vivo effect of 3,5,3'-triiodothyronine on calcium uptake in several tissues in the rat: evidence for a physiological role for calcium as the first messenger for the prompt action of the thyroid hormone at the level of the plasma membrane. *Endocrinology*, v.127, p.17-24, 1990.
- SETCHELL, B.P.; BROOKS, D.E. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of male reproductive tract. In: KNOBILL, E.; NEILL, J. *The Physiology of Reproduction*. Nova York: Raven Press Ltd., 1988.

- SHOTWELL, M.A.; JAYME, D.W.; KILBERG, M.S.; OXENDER, D.L. Neutral amino acid transport systems in chinese hamsterbovary cells. *The Journal of Biology Chemistry*, v.256, p.5244-5247, 1981.
- SHOTWELL, M.A.; KILBERG, M.S.; OXENDES, D.L. The regulation of neutral amino acid transport in mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.737, p.267-284, 1983.
- SILVA, F.R.M.B.; WASSERMANN, G.F. Kinetics of FSH stimulation of methylaminoisobutyric acid uptake in Sertoli cell in culture from testes of 15 day-old rats. *Medical Science Research*, v.27, p.627-630, 1999.
- SILVA, F.R.M.B.; RENCK, L.; WASSERMANN, G.F. Retinol stimulates amino acid transport in Sertoli cell by a mechanism unrelated to protein synthesis. *Medical Science Research*, v.23, p.155-156, 1995.
- SILVA, F.R.M.B.; LEITE, L.D.; BARRETO, K.P.; D'AGOSTINI, C.; ZAMONER, A. Effect of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on amino acid accumulation and membrane potential in Sertoli cells of the rat testis. *Life Science*, v.69, p.977-986, 2001.
- SILVA, F.R.M.B.; LEITE, L.D.; WASSERMANN, G.F. Rapid response in Sertoli cell. *European Journal of Endocrinology*, v.147, p.1-9, 2002.
- SKINNER, M.K. Cell-cell interactions in the testis. *Endocrinology Reviews*, v.12, n.1, p.45-68, 1991.
- SNEDECOR, G.W.; COCKRAN, W.G. Correlation. In: *Statistical Methods*. Ames, USA: The Yowa State University Press, 1973. p.172-195.
- SPEDDING, M.; PAOLETTE, R. Classification of calcium channels and the sites of action of drugs modifying channel function. *Pharmacological Reviews*, v.44, p.363-367, 1992.
- SPRITZER, P.M.; WASSERMANN, G.F. Amino acid uptake and protein synthesis in rat testes: stimulation by dissociable factors. *Hormone and Metabolic Research*, v.17, p.237-240, 1985.
- SPRITZER, P.M.; WASSERMANN, G.F. Amino acid uptake and protein synthesis in rat testes: stimulation by dissociable factors. *Hormone and Metabolic Research*, v.17, p.237-240, 1985.
- TALEB, O.; FELTZ, P.; BOSSU, J.L.; FELTZ, A. Small-conductance chloride channels activated by calcium on cultured endocrine cells from mammalian pars intermedia. *Pfluegers Archives*, v.6, p.412-641, 1988.
- TARANTA, A.; MORENA, A.R.; BARBACCI, E.; D'AGOSTINO, A. Conotoxisensitive  $Ca^{+2}$  voltage-gated channels modulate protein secretion in cultured rat Sertoli cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.126, p.117-123, 1997.

TWYMAN, R.E.; MacDONALD, R.L. Neurosteroid regulation of GABA receptor single-channel kinetic properties of mouse spinal cord neurons in culture. *Journal of Physiology*, v.456, p.215-245, 1992.

VALVERDE, M.A.; HARDY, S.P.; DIAZ, M. Activation of Maxi Cl<sup>-</sup> channels by antiestrogens and phenothiazines in NIH3T3 fibroblast. *Steroids*, v.67, p.439-445, 2002.

VALVERDE, M.A.; ROJAS, P.; AMIGO, J.; COSMELLI, D.; ORIO, P.; BAHAMONDE, M.I. et al. Acute activation of maxi-K channels (hsk) by estradiol binding to the  $\beta$  subunit. *Science*, v.285, p.1929-1931, 1999.

WASSERMANN, G.F.; LOSS, E.S. Effect of a calcium channel blocker, verapamil, on amino acid uptake stimulated by FSH in rat testes. *Medical Science Research*, v.17, p.779-780, 1989.

WASSERMANN, G.F.; MONTI BLOCH, L.; McCONNELL, L.L.; GRILLO, M.L. FSH-induced hyperpolarization followed by a Ca<sup>++</sup> channel-mediated depolarization in rat Sertoli cells. *Medical Science Research*, v.18, p.175-176, 1990.

WASSERMANN, G.F.; MONTI BLOCH, L.; GRILLO, M.L.; SILVA, F.R.M.B.; LOSS, E. S.; McCONNELL, L. L. Biochemical factors involved in the FSH action on amino acid transport in immature rat testes. *Hormone and Metabolic Research*, v.24, p.276-279, 1992a.

WASSERMANN, G.F.; MONTI BLOCH, L.; GRILLO, M. L.; SILVA, F.R.M.B.; LOSS, E. S.; McCONNELL, L.L. Electrophysiological changes of Sertoli cells produced by the acute administration of amino acid and FSH. *Hormone and Metabolic Research*, v.24, p.326-328, 1992b.

WASSERMANN, G.F.; SILVA, F.R.M.B.; GRILLO, M.L.; LOSS, E.S.; LEITE, L.; VON LEDEBUR, E.I.C.F. Retinol stimulates amino acid transport in Sertoli cell by a Ca<sup>++</sup> related mechanism. *Medical Science Research*, v.21, p.437-438, 1993.

WASSERMANN, G.F.; FAUTH, M.G.; BARRETO, K.P.; GRILLO, M.L. Vanadate impairs the action of insulin on amino acid transport in the adrenal cortex of rats and cows. *Medical Science Research*, v.22, p.27-29, 1994.

WASSERMANN, G.F.; LOSS, E.S.; WECHSLER, S.W. Retinol stimulates <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup> uptake in Sertoli cells through a verapamil-sensitive voltage-dependent-channel. *Medical Science Research*, v.23, p.633-634, 1995.

WASSERMANN, G.F.; LOSS, E.S.; BARRETO, K.P.  $\hat{A}$ -adrenergic stimulation of amino acid transport in Sertoli cell-enriched testes of rats is dependent of its action on protein synthesis. *Medical Science Research*, v.24, p.149-151, 1996.

WICKENDEN, A.D. K<sup>+</sup> channels as therapeutic drug targets. *Pharmacology & Therapeutics*, v.5484, p.1-26, 2002.

WEISS, J.N.; VENKATESH, N.; LAMP, S.T. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and cellular K<sup>+</sup> loss in hypoxic and ischaemic mammalian ventricle. *Journal of Physiology*, v.477, p.649-637, 1992.

WRUTNIAK, C.; ROCHARD, P.; CASAS, F.; FRAYSSE, A.; CHARRIER, J.; CABELLO, G. Physiological importance of the T<sub>3</sub> mitochondrial pathway. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.839, p.93-100, 1998.

WRUTNIAK-CABELLO, C.; CASAS, F.; CABELLO, G. Thyroid hormone action in mitochondria. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.26, p.67-77, 2001.

ZANELLO, L.P.; NORMAN, A.W. Stimulation by 1alpha,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> of whole cell chloride currents in osteoblastic ROS 17/2.8 cells: a structure-function study. *Journal Biological Chemistry*, v.272, p.22617-22622, 1997.